***Занятие 16***

**Микробиологическая диагностика туберкулеза и актиномикоза. Микробиологическая диагностика инфекций, вызываемых патогенными спирохетами**

***Mycobacterium tuberculosis***

**Морфо-биологические особенности.** *M. tuberculosis* – палочковидная бактерия длиной 0.4-3 мкм. Встречается в виде полиморфных палочек, а также кокковидных и нитевидных форм. В одной и той же культуре встречаются прямые, изогнутые, колбовидные, очень мелкие, фильтрующиеся через бактериальные фильтры, могут содержать кислотолабильные гранулы (зерна Муха) в цитоплазме. Неподвижны, спор и капсул не образуют, имеют микрокапсулу. Облигатные аэробы. *Отличительное культуральное свойство –* растут медленно и только на специальных питательных средах. ***Метод Циля-Нильсена –*** в окрашенных препаратах микобактерии располагаются одиночно, либо в виде скоплений , напоминающих цифру V, красного цвета *кислотоустойчивые палочки* (за счёт высокого содержания в клеточной стенке липидов, состоящих из миколoвых кислот.)

**Культуральные свойства.** Отличительным культурным свойством M.tuberculosis, по типу дыхания относящемуся к облигатным аэробам, является его потребность в питательных средах и постепенное развитие. Развитие и размножение происходит в основном делением или, что сложнее, почкованием. Причиной медленного роста в культуре является то, что M.tuberculosis очень поздно делится, примерно каждые 18-20 часов.

***Культивация M.tuberculosis***

* ***Полусинтетический питательный агар:***

 *Среды Миддлбрука 7H10*  и  *7H11*

* ***Яичные питательные среды:***

 *Среды Левенштейна-Йенсена, Финна-2*

* ***Жидкие среды***:

Среды *Миддлбрука 7H9* и *7H12*

* Полусинтетические среды (например, среды *Middlebrook 7H10 и 7H11*) – содержат соли, кофакторы, витамины, альбумин, каталазу и глицерин. Среда Middlebrook 7H11 также содержит гидролизат казеина. M.tuberculosis развивается в этой среде в течение нескольких недель. Эти среды в основном используются для изучения культуральных свойств, а также для тестов на чувствительность.
* Среда, содержащая желток (например, среда Левенштейна-Йенсена, Finna II) - среда Левенштейна-Йенсена содержит соли, глицерин и сложные органические ингредиенты (яичный желток, картофельная мука и т. д.). M.tuberculosis развивается на этой среде в течение 3-6 недель, так как для первоначального культивирования необходимо небольшое количество инокулята, эти среды используют при первоначальном культивировании микобактерий. Среда Левенштейна-Йенсена рекомендована ВОЗ в качестве стандартной среды для культивирования микобактерий.
* В отличие от среды Левенштейна-Йенсена, в среде Финна II аспарагин заменяется глутамином, и микобактерии растут в этой среде несколько быстрее.

Жидкие среды (например, среды *Middlebrook* 7Н9 и 7Н12) позволяют получить первичную культуру микобактерий быстрее, чем комплексные среды, и с использованием меньшего количества инокулята

***M.tuberculosis*** –образуют через 15-20 дней в виде сухого налёта светло-кремовые колонии с неровными краями, напоминающие цветную капусту (вирулентные R-колонии )

* На жидких средах дают рост через 5-7 дней в виде сухого, плотного, морщинистого налёта кремового цвета. Под этим налётом питательная среда остаётся прозрачной.

***Mycobacterium tuberculosis (биохимические особенности)***

* *M.tuberculosis* обладает слабой биохимической активностью.
* ***Ферменты:***

 ***- Ферменты каталаза и пероксидаза*** – чувствительные к изониазиду штаммы обладают высокой каталазной и пероксидазной активностью, а резистентные – низкой за счет мутации в гене Kat G

 - аминотрансфераза

 - эстераза

 - трегаллоза

 - амидаза

* Редуцирует нитраты в нитриты
* *M.tuberculosis* обладает слабой биохимической активностью. Имеет такие ферменты, как аминотрансфераза, эстераза, трегаллаза и амидаза. Особый интерес представляют ферменты каталаза и пероксидаза. Вирулентность M.tuberculosis и его устойчивость к препаратам из группы гидразидов изоникотиновой кислоты (изониазид) связаны с этими ферментами (активность гена KatG). Изониазидчувствительные штаммы возбудителей туберкулеза обладают высокой, а изониазидрезистентные - слабой каталазной и пероксидазной активностью.
* В отличие от M.bovis и условно-патогенных микобактерий M.tuberculosis продуцирует никотиновую кислоту (ниацин). Поскольку никотиновая кислота накапливается в больших количествах в жидкой питательной среде, ее можно обнаружить с помощью ниацинового теста в культуральной жидкости. Этот тест основан на образовании бледно-желтого комплексного соединения с никотиновой кислотой в растворе цианида калия и хлорамина Б.
* Резистентные к изониазиду штаммы не синтезируют ниацин.
* В отличие от M.bovis, M.tuberculosis восстанавливает нитраты до нитритов
* ***Ниациновый тест*** - В отличие от *M.bovis* и условно-патогенных микобактерий, *M.tuberculosis* выделяет никотиновую кислоту (ниацин). Тест основан на образовании комплексного соединения цианида калия и раствора хлорамина Б с никотиновой кислотой который дает при этом ярко желтое окрашивание.

**Факторы патогенности.**

* ***Липиды:*** составляют до 10-40% сухого остатка микробов и обеспечивают микобактериям кислотоуйчивость.
* ***Белки:*** до 60%, обусловливают антигенные свойства
* ***Полисахариды****:* 15%, участвуют в развитии гиперчувствительности замедленного типа и образовании антител
* В связи с наличием соединения миколовой кислоты и углеводов (трегалоза - 6,6 -димиколат) - ***«корд» фактора,***  возбудители туберкулёза растут в виде жгутов или кос (англ., *cord* – верёвка, шнур) в микрокультуре, и под микроскопом видны в виде параллельных цепочек.
* ***«Корд» фактор:***
* *-* Ослабляет миграцию лейкоцитов
* - Участвует в развитии хронической гранулёмы
* - Играет роль иммунологического адьюванта

***«Старый туберкулин Коха»*** состоит из концентрата, полученного из фильтрата 6-ти недельной глицериновой бульонной культуры.

«***Новый туберкулин***» *-* получен при химической очистке старого туберкулина Коха, называется PPD (англ., *purified protein derivate* – очищенный дериват белка). Его биологическая активность определяется в «туберкулиновых единицах» (TЕ).

**Чувствительность животных.** В естественных условиях животные менее восприимчивы к M.tuberculosis.Среди подопытных животных более чувствительны к этой бактерии морские свинки, при подкожном заражении которых развивается инфекция, сопровождающаяся генерализацией и гибелью в течение 2-3 мес.

**Источник инфекции и пути передачи**. Источником инфекции являются больные туберкулёзом, выделяющие возбудителей с мокротой в окружающую среду. Заражение происходит воздушно-капельным и воздушно-пылевым путём. Возможно заражение плода трансплацентарным путём. В редких случаях заражение происходит пищевым путём при употреблении термически не обработанных мясо-молочных продуктов. Это характерно для туберкулёза, вызванного *M.bovis*

**Патогенез туберкулёза.** Туберкулёз это первичное хроническое заболевание, которое сопровождается поражением различных органов и систем. В основе патологического процесса лежит образование в тканях специфических гранулём. Инкубационный период длится от нескольких недель до нескольких лет, иногда более длительный период. Первичный туберкулёз – попадание аэрогенным путём большой дозы высоковирулентного возбудителя туберкулёза, который сопровождается в легких формированием первичных очагов и образованием первичного туберкулёзного комплекса. Диссеминированный туберкулёз. Вторичный туберкулёз – наблюдается у ранее зараженных людей при активации старого эндогенного очага.

***Незавершенный фагоцитоз -***в слизистых оболочках микобактерии, подвергнутые фагоцитозу макрофагами, переносятся в регионарные лимфатические узлы где они долго сохраняются в латентном состоянии.

Наиболее часто заражение происходит через дыхательные пути. Попавшие в организм микобактерии захватываются альвеолярными и легочными макрофагами. В месте попадания может развиться первичный аффект. Далее возбудитель транспортируется в регионарные лимфоузлы, вызывая воспалительную реакцию - лимфангоит и лимфаденит. Первичный аффект, лимфангоит и лимфаденит - первичный комплекс (первичный очаг туберкулеза), характеризующийся образованием по ходу лимфатических путей и узлов гранулем в виде бугорков (бугорчатка или туберкулез). Образование гранулем представляет собой клеточную реакцию ГЗТ на ряд химических компонентов микобактерий. В центре гранулемы в очаге некроза (казеозного распада) находятся микобактерии. Очаг окружен гигантскими многоядерными клетками Пирогова - Лангханса, их окружают эпителиоидные клетки а по периферии - лимфоциты, плазматические и мононуклеарные клетки. В гранулемах обычно замедляется или прекращается размножение возбудителя. Вокруг гранулёмы образуется соединительнотканная капсула, происходит заживление очага, воспаление рассасывается, некротические массы уплотняются и в результате скопления солей кальция очаг обызвествляется, таким образом образуется очаг Гона. В результате микобактерии переходят в L-формы и длительно сохраняются в организме.

***Каверна*** – при снижении резистентности гранулёмы подвергаются некрозу и L-формы бактерий переходят в вирулентную форму. В результате этого процесс активируется, возбудители проникают в окружающие ткани, иногда в ткани лёгких образуя полости – *каверны*.

**Клинические формы туберкулёза.**

В зависимости от локализации различают 3 клинические формы:

* ***Первичная туберкулёзная интоксикация у детей и подростков*** ;
* ***Туберкулёз органов дыхания*** (лёгких и внутренних лимфатических узлов грудной полости) ;
* ***Туберкулёз других органов и систем*** ( туберкулёз желудка и кишечника, туберкулёз почек, туберкулёзный менингит, туберкулёз костей, туберкулёз кожи и др.)

**Иммунитет.**

* Нестерильный, инфекционный
* Антитела не обладают протективной активностью
* Факторы клеточного иммунитета играют решающую роль

 -Фагоцитоз носит незавершенный характер

* Развивается гиперчувствительность замедленного типа.

**Микробиологическая диагностика.**

* *Материал для исследования при лёгочной форме:*

 - мокрота

 - бронхиальный смыв

 - плевральная жидкость

* *Материал для исследования при других формах заболевания:*

 - цереброспинальная жидкость

 - моча

 - асцитическая жидкость

 - биоптаты из соответствующих органов

*В микробиологической диагностике туберкулёза могут быть применены все микробиологические методы!*

* ***Метод микроскопии*** – прямая микроскопия мазка приготовленного из патологического материала и окрашенного по Цилю-Нильсену.
* ***Люминесцентная микроскопия*** –основана на способности липидов микобактерий окрашиваться люминесцентными красителями и люминесцировать (светиться) под влиянием ультрафиолетовых лучей.
* ***Бактериологический метод* -** *«золотой стандарт»,* получение культуры возбудителя, его идентификация и изучение чувствительности к химиотерапевтическим препаратам*.*
* ***Метод микрокультуры Прайса*** –применяется для ускоренной диагностики (1-2 недели) .
* ***Метод автоматизированной культивации*** – используется система *BACTEC MGIT*. Внутри системы культивации *BACTEC* в пробирках *MGIT* (*Mycobacteria Growth Indicator Tube*) имеется модифицированный питательный бульон *Middlebrook 7H9.*
* ***Молекулярно-генетический метод (ПЦР)*** – позволяет сократить время исследования до двух дней, чувствительность 55-90%, специфичность около 100%.
* ***Серологический метод*** *-* ИФА, служит для обнаружения в сыворотке крови специфических антител к возбудителю туберкулёза. С помощью ИФА определяют не заболевание, а инфицирование.
* ***Биологический метод –*** обнаружение возбудителей туберкулёза в патологическом материале основано на заражении лабораторных животных.

* **Кожно-аллергическая проба** основана на реакции ГЗТ (латентная туберкулёзная инфекция) к туберкулину. Для этого определённая доза туберкулина (PPD) вводится в виде внутрикожной инъекции на передней поверхности предплечья ***(проба Манту)***. Эта проба широко используется для массового обследования населения, и своевременного выявления первичного заражения (виража) детей и подростков.
* Положительная туберкулиновая проба показывает не заболевание, а инфицирование.

**Определение чувствительности возбудителя туберкулёза к химическим терапевтическим препаратам:**

* ***Метод точной концентрации -*** основан на культивации *M.tuberculosis* на питательных средах с добавлением противотуберкулёзных препаратов в определённой концентрации.
* ***Резазуриновый тест*–**основан на редукции резазурина и изменения цвета среды, позволяет более быстро оценивать рост микобактерий.
* ***Определение генов резистентности с помощью ПЦР***
* Мутация в гене *InhA,* кодирующем ферменты миколовой кислоты – чувствительность к изониазиду
* Мутация в гене *rpsL,* кодирующем рибосомальный протеин – чувствительность к стрептомицину
* Чувствительность к рифампицину, возможно, связана с изменениями субкомпонента b в РНК-полимеразе (мутация в гене *rpoB*)

**Лечение туберкулёза:**

* *Препараты первого ряда*: изониазид, рифампицин, пиразинамид, этамбутол и стрептомицин
* *Препараты второго ряда :* канамицин, этионамид, циклосерин, хинолоны, (офлоксацин, ципрофлоксацин) более токсичные и мало эффективные
* *Современный стандарт химиотерапии туберкулёза* – лечение проводится четырьмя препаратами первого ряда – комбинацией изониазида, рифампицина, пиразинамида, этамбутола непрерывно в течение 6-9 месяцев.

**Профилактика туберкулёза:**

* ***Специфическая профилактика* –** проводят с помощью вакцины BCG (*bacillus Calmette-Guerin*)
* ***Bакцина BCG*** вводится новорожденным на первой неделе жизни в виде внутрикожной инъекции.
* Ревакцинация в 7 и 12 лет, затем до 30 лет через каждые 5-6 лет.
* Недоношенных детей иммунизируют слабо реактогенной вакциной BCG-M , в которой количество бактерий в 2 раза меньше.

***Mycobacterium bovis***

* Возбудителем около 5% случаев является микобактерия бычьего типа - *Mycobacterium bovis* .
* *M.bovis* отличается от *M.tuberculosis* по морфо-биологическим показателям .
* Для дифференциации *M.bovis* и *M.tuberculosis*  применяют ниациновый тест и биопробы на кроликах. *M.bovis* не образует никотиновую кислоту (ниацин) и непатогенна для кроликов.
* *Mycobacterium africanum* по морфобиологическим показателям часто идентифицируется как *M.bovis* .
* *M.africanum* встречается, в основном, в Африке и только в 5% случаев является возбудителем туберкулёза в других странах.
* Является патогеноой для морских свинок, мышей и, в меньшей степени, кроликов.

***Атипичные микобактерии***

|  |
| --- |
| **Атипичные бактерии****классификация Раньона**  |
| **I группа** | **Медленно развивающиеся фотохромогенные микобактерии.** | *M.kansasii M.marinum, M.simiae* и др.  |
| **II группа** | **Медленно развивающиеся скотохромогенные микобактерии.** | *M.scorfulaceum, M.szulgai,* *M.flavescens, M.gordonae* и др. . |
| **III группа** | **Медленно развивающиеся нехромогенные микобактерии.** | (*M.avium complex, M.xenopi*, *M.ulserans, M.gastri, M.celatum* и др. .  |
| **IV группа** | **Быстро развивающиеся микобактерии.** | *M.chelonei* qrupu, *M.fortuitum* qrupu, *M.smegmatis, M.phlei* и др. .  |

**Возбудитель лепры (*Mycobacterium leprae*)**

***M.leprae –*** прямые либо слегка изогнутые палочки длиной 4-5 мкм.

По морфо-биологическим показателям напоминает возбудитель туберкулёза. Грамположительные неподвижные палочки, спор и капсул не образуют, имеется микрокапсула.

В связи с устойчивостью к кислоте и спирту, окрашиваются по *Цилю-Нильсену* в *красный цвет*.

* У большинства броненосцев через 15 месяцев после заражения большими дозами *M.leprae* развивается специфический генерализованный процесс.
* У этих животных развиваются такие же клинические симптомы, как у людей при лепроматозной форме лепры. Но, в отличие от людей, у броненосцев повреждение тканей лёгких происходит быстрее и интенсивнее.
* В поражённых тканях броненосцев концентрация возбудителя в сотни раз больше, чем в эквивалентных тканях у заболевших людей.

**Источник инфекции и пути передачи:**

* Источником инфекции является больной человек.
* Заболевание передаётся при непосредственном контакте либо воздушно-капельным путём.
* Больные лепрой, в слизи носа у которых находится большое количество *M.leprae,* являются более опасными*.*
* Доказано внутриутробное заражение, но после рождения большинство детей, отдалённых от родителей, не заболевают лепрой.
* ***Слабо контагиозное.***

**Патогенез лепры:**

* ***Туберкулоидная форма*** – доброкачественная. Эта форма характеризуется формированием эпителиоидных и гигантоклеточных гранулём в коже и слизистых оболочках.
* ***Лепроматозная форма*** – Эта форма характеризуется формированием на коже и слизистых оболочках гранулём, состоящих из «лепрозных клеток» (клеток Вирхова), плазмоцитов, лимфоцитов и фибробластов, а также повреждением периферических нервов.
* ***Недифференцированные формы -*** промежуточная форма

**Клинические симптомы лепры:**

* Лепра – первичное генерализованное хроническое заболевание, которое сопровождается гранулематозным повреждением кожи и верхних дыхательных путей, а так же периферической нервной системы и внутренних органов.
* Инкубационный период в среднем составляет 2-10 лет, иногда длиться до 20 лет. Только у 5-10% заражённых развиваются манифестные формы.
* ***Туберкулоидная форма –*** проявляется образованием узелков, состоящих из грануляционной ткани, на коже и слизистых оболочках (название болезни «лепроз» в переводе с греческого означает «бугристый»). Одной из важнейших особенностей этих узлов является их анестезия, т.е. потеря чувствительности.
* ***Недифференцированная форма*** – проявляется образованием кожных высыпаний и поражением периферических нервов, может трансформироваться в туберкулоидную или лепраматозную форму. Кожные высыпания представляют собой резко ограниченные пятна (леприды) различной величины и цвета, сначала гиперестетические, а затем анестезирующие.
* При ***лепроматозной форме*** узелки выглядят как красно-коричневые инфильтраты преимущественно на лице и дистальных отделах конечностей. Нередко у больных выпадают брови и ресницы, а узелки и инфильтраты придают лицу «львиное лицо». Лимфатические узлы, особенно паховые и локтевые, увеличиваются и богаты микобактериями. Обезболивания гранулем не наблюдается, они сохраняются много лет, претерпевают рубцовые изменения или рассасываются.

**Микробиологическая диагностика:**

**Материал для исследования**

 - соскоб со слизистой оболочки перегородки носа

 - скарификация повреждённых тканей

 - тканевая жидкость, полученная при пункции увеличенных лимфатических узлов.

* ***Метод микроскопии*** – обнаружение кислотоустойчивых бактерий в мазках, окрашенных по Цилю-Нельсену.
* ***бактериологический метод*** – инокуляция материала на питательных средах
* ***биологический метод***- не патогенны для морских свинок и кроликов в отличие от возбудителя туберкулеза
* ***Тест на лепромин*** – не имеет диагностического значения, поскольку даёт отрицательный результат при лепроматозной форме и положительный результат при туберкулоидной форме у многих здоровых людей.
* В результате внутрикожной инъекции лепромина через 48 часов развивается первичная ***реакция Фернандеса***, а через 3-4 недели поздняя ***реакция Мицуды***.
* ***Серологический метод*** – с помощью ИФА обнаруживаются антитела к гликолипидам *M.leprae.*
* **Профилактика.** Для специфической профилактики лепры не разработаны препараты. В эндемичных зонах используется вакцина БЦЖ, составной частью которой является лепромин А. Для изоляции больных лепрой размещают в специальные учреждения *лепрозории.*

**Лечение лепры:**

* К противолепрозным препаратам относятся препараты сульфонового ряда, в основном, ***дапсон***. Дапсон считается основным препаратом для лечения всех форм лепры.
* Кроме, этого назначается рифампицин и клофазимин.
* К другим препаратам, эффективным в отношении *M.leprae* относятся **миноциклин, кларитромицин** и некоторые **фторхинолоны**.

**Актиномицеты (классификация)**

Промежуточные между бактериями и грибами микроорганизмы актиномицеты объединены в порядке *Actinomycetales.*

* В этом порядке находятся также патогенные для человека семейства *Actinomycetaceae, Nocardiaceae* и *Streptomycetaceae,* к которым, соответственно, относятся роды *Actinomyces, Nocardia* и *Streptomyces.*
* Для патологии человека наиболее важными являются виды *A.israelii*и*A.naeslundii* . *A.viscosus, A.odontolyticus и A.bovis*  очень редко вызывают заболевания.

**Морфо-биологические особенности:**

* *Род Actinomyces* – грамположительные, тонкие, прямые или слегка изогнутые палочки размером 1-3 мкм. В процессе развития образуют мицелиеподобные филаменты, длинные цепочки, иногда разветвления длиной 10-50 мкм.
* Слабо окрашиваются по Граму, как правило, грам-положительные, некоторые виды кислотоустойчивые.

***Actinomyces bovis- культуральные особенности:***

* Факультативные анаэробы , капнофилы
* Растут на питательных средах в течение 1-2 недель, а на обогащённых средах, таких как кровяной агар с сердечно-мозговым экстрактом через 24-48 часов образуют субстратный мицелий , состоящий их *«паутинных микроколоний»*
* Через неделю микроколонии превращаются в колонии с неровной поверхностью, напоминающей «коренные зубы».

***Основные дифференциальные отличия бактерий рода Actinomyces***

|  |  |
| --- | --- |
| **Показатели** | ***Виды*** |
| **A.israelii** | **A.naeslundii** | **A.viscosus** | **A.odontolyticus** | **A.bovis** |
| **Рост в аэробных условиях** | **-** | **+** | **+** | **+** | **+** |
| **Каталаза** | **-** | **-** | **+** | **-** | **-** |
| **Уреаза** | **-** | **+** | **+** | **-** | **-** |
| **Крахмал** | **-** | **-** | **-** | **-** | **+** |
| **Арабиноза** | **±** | **-** | **-** | **-** | **?** |
| **Инозит** | **+** | **+** | **+** | **-** | **?** |
| **Ксилоза** | **+** | **-** | **-** | **-** | **±** |
| **Маннит** | **+** | **-** | **-** | **-** | **-** |
| **Манноза** | **+** | **±** | **+** | **-** | **?** |

**Экология**

* Бактерии *Actinomyces* широко распространены в окружающей среде.
* Находятся в воде, воздухе, различных предметах, телах растений, животных и человека. Основная среда обитания – почва.
* Являются представителями нормальной микрофлоры полости рта и желудочно-кишечного тракта человека и млекопитающих.

**Источник инфекции и пути передачи:**

* Различают эндогенную и экзогенную инфекцию.
* *Эндогенная инфекция* часто развивается в результате проникновения актиномицетов ротовой полости и пищеварительного тракта в окружающие ткани при травмах и хирургических вмешательствах.
* Источником *экзогенной инфекции* является почва. Возбудители обычно проникают в организм при травмах через раневую поверхность.

**Патогенез и клиника:**

* Возбудители оппортунистической инфекции.
* Чувствительность к актиномицетам у людей с нормальным иммунным статусом низкая, а у людей с иммунодефицитом высокая.
* Одним из основных факторов патогенеза является ослабление иммунитета, в особенности, защитных свойств слизистых оболочек.
* Актиномикоз это хроническая гнойно-гранулематозная инфекция. Вокруг актиномицетов, проникающих со слизистой оболочки и повреждённой кожи формируется специфическая гранулёма (***актиномикома),*** внутри которой при взаимодействии актиномицетов с элементами тканей образуются друзы («серные гранулы»).
* В зависимости от локализации различаются три основные формы заболевания – шейно-лицевая, торакальная и абдоминальная.

**Друзы.**

***Друзы-*** желтоватые, округлые образования диаметром 1 мм часто состоят из макрофагов, других тканевых клеток и актиномицетов. С периферической части друз выступают дубинкообразные расширенные эозинофильные клетки актиномицетов.

**Микробиологическая диагностика:**

* ***Материал для исследования:***

 - мокрота

 - ликвор

 - гной

 - биоптат из грануляции тканей

* ***Микроскопический метод***:

 - Обнаружение друз в нативном материале

 - Окраска по Граму: споры окрашиваются в тёмно-фиолоетовый, мицелии в фиолетовый, а друзы в розовый цвет.

 - Окраска по Цилю-Нильсену: мицелий окрашивается в синий, а споры в красный цвет.

* ***Бактериологический метод*** – производят посев патологического материала на питательные среды (кровяной агар с сердечно-мозговым экстрактом), культивируют в капнофильных либо анаэробных условиях. Полученную культуру идентифицируют по морфобиологическим особенностям.
* В некоторых случаях ставится ***аллергическая реакция*** с актинолизатом. Положительные и резко положительные результаты имеют диагностическое значение.

 - При висцеральном актиномикозе аллергическая реакция часто даёт отрицательный результат.

**Лечение**

* Чувствительны к пенициллину, тетрациклину, эритромицину и клиндамицину.
* Резистентны к антифунгальным препаратам.
* В связи с тем, что антибиотики плохо проникают в полость абсцессов и гранулём, иногда требуется *хирургическое вмешательство*.

**Нокардии**

* Бактерии рода *Nokardia* вызывают у людей заболевания нокардиозы.
* Нокардиозы часто вызываются комплексом *Nocardia asteroides* (*Nocardia farcinica, Nocardia nova, Nocardia abscessus* и др. видами), в редких случаях видами *Nocardia brasiliensis* и  *Nocardia otitidiscaviarum* и в очень редких случаях другими видами.

***Nocardia asteroides - Морфо-биологические свойства:***

***Нокардии* –** это палочковидные бактерии, обладающие сильно разветвлённым воздушным и субстратным мицелием**.** В первые часы мицелий делится на сегменты и состоит из одной клетки. Постепенно, мицелии, образуя перегородки (септы) делятся на палочковидные и кокковидные элементы**.** Они грамположительные и частично кислотоустойчивые**.**

Развивается на обычных питательных средах при температуре 28-370C в аэробных условиях. На питательных средах через несколько дней, или неделю, образуют клубочковые восковидные колонии. Синтезирует и выделяет в питательную среду пигмент от белого до розового, даже красного цвета.

* **Источник инфекции и возбудитель:**

 **-** Источник инфекции почва.

 *- N.asteroides,* в основном, попадает в организм воздушно-пылевым (аэрогенным) путём и вызывает хроническую инфекцию лёгких.

 *- N.brasiliensis -*  заражение происходит при попадании почвы через поврежденную кожу при травмах, в результате образуются подкожные поражения.

* Лечение кортикостероидами, трансплантация органов, СПИД, туберкулёз могут способствовать развитию нокардиозов.
* К основным формам относятся нокардиозы кожи и лёгких.

 *-* Наиболее распространёнными являются нокардиоз лёгких, вызванный  *Nocardia asteroides*

 *-* нокардиоз кожи, вызванный *Nocardia brasiliensis* и приводящий к подкожным образованиям

**Микробиологическая диагностика :**

* **Материал для исследования:**

 - мокрота

 - гной

 - ликвор

 - биоптаты тканей

* ***Микроскопический метод –*** обнаруживаются грам-положительные коккобациллы, а также разветвлённые филаменты.
* ***Бактериологический метод -*** получение культуры возбудителя

**Лечение**

* Препарат выбора **сульфометоксазол-триметоприм (бисептол)**
* Если лечение бисептолом малоэффективно, применяют антибиотики **амикацин, имипинем, цефотаксим** и другие антибиотики.
* Поскольку некоторые антибиотики не проникают внутрь полостей абсцесса и гранулём, в некоторых случаях требуется хирургическое вмешательство.

**Возбудители актиномицетомы:**

* Актиномицетома является одним из видов мицетом и образуется при заражении, в основном, актиномицетами *Nocardia asteroides*, *Nocardia brasiliensis, Streptomyces* *somaliensis* и *Actinomadura madurae* .
* Возбудители актиномицетомы обитают в почве и на поверхности растений.
* Возбудитель проникает в организм через повреждённую кожу. Постепенно образуются папула, глубокие узлы и абсцессы.
* Деструктивный процесс распространяется на фасции, мышцы и кости. Развивается фибринозная ткань. Стопа опухает и процесс, проникая в кости, приводит к деформации стопы. Из фистул, открывающихся на поверхность кожи, выделяется гной.

**Микробиологическая диагностика и лечение:**

***Микроскопический метод*** – основан на обнаружении друз и разветвлённых актиномицетов в гное и биоптатах..

* **Лечение:**

 - стрептомицин,

 - комбинация сульфометоксазол-триметоприма и дапсона

 - хирургическое вмешательство (ампутация поражённой конечности)

**Занятие 9**

**Микробиологическая диагностика заболеваний, вызываемых спирохетами и риккетсиями**

**Спирохеты**

Спирохеты (speria-завиток, chaite-волос) — спиралевидные, скрученные, подвижные микроорганизмы. По своим морфологическим и некоторым биологическим признакам спирохеты занимают промежуточное положение между бактериями и простейшими и входят в отряд Spirochetales. Отряд состоит из двух семейств. Семейство Spirochaetaceae состоит из свободноживущих непатогенных спирохет. Патогенные для человека роды спирохет Treponema, Borrelia и Leptospira относятся к семейству Treponemataceae.

Род Трепонема (с латинского *trepo* – изгиб, *nema – н*ить) включает множество видов. Свободноживущие в природе формы трепонем не встречаются. Они обитают в полости рта, в желудочно-кишечном тракте и половых органах различных животных.

Некоторые виды рода *Treponema –T. denticola, T. macrodenticum, T. orale, T. vincentii* входят в состав микрофлоры полости рта: *Т. vincentii* в сочетании с фузобактериями вызывает некротическую ангину Винсента.

Важную роль в патологии человека играет вид ***T. pallidum***. Вид подразделяется на 3 подвида: подвид *pallidum – возбудитель* сифилиса, подвид *endemicum – возбудитель* эндемического сифилиса или беджели, и подвид *pertenue – возбудитель* фрамбезии. *T. carateum* вызывает у людей болезнь «пинта».

**Морфо-биологические свойства.** *T.pallidum* –спиралевидные бактерии длиной 5-15 мкм ,толщиной 0,2 мкм, имеющие 8-12 равномерных завитков. Расстояние между завитками составляет 1 мкм. Это типичные по морфологии трепонемы. Слабо окрашиваются анилиновыми красителями. По Романовскому-Гимзе окрашиваются в бледно-розовый цвет (отсюда название вида бледная спирохета, от лат. *pallidum* - бледный). Выявляются при импрегнации серебром (метод серебрения по Морозову). Подвижные спирохеты в нативных мазках выявляют с помощью фазово-контрастной и темнопольной микроскопии.

* В свежеприготовленных препаратах спирохеты обладают активной подвижностью – совершают вращательные, поступательные, сгибательные и винтообразные движения, выявляемые при темнопольной микроскопии.
* Сгибательные движения под прямым углом без потери спиралевидной формы является важным дифференциальным признаком рода *Тreponema*. Название рода «Трепонема» связано именно с этой особенностью (лат., означает «сгибающаяся нить»).

**Культуральные свойства**. Возбудитель сифилиса является микроаэрофилом. Вирулентные штаммы *T.pallidum* не культивируются как на искусственных питательных средах, так и на культуре клеток. Невирулентные штаммы (н-р, штамм Рейтера) можно культивировать *in vitro* в анаэробных условиях при температуре 35 0С в агаре с содержанием аминокислот, витаминов, солей, минералов и сывороточных альбуминов. На 3-5-е сутки культивирования появляются мелкие, гладкие колонии. Культивирование приводит к потере вирулентных и изменению антигенных свойств.

**Антигенная структура**. Антигенная структура недостаточно изучена. В организме к возбудителю образуются специфические антитела, которые выявляют методом непрямой иммунофлюоресценции, а также реакцией иммобилизации. Антитела обладают способностью разрушать бактерии и связывать комплемент при участии трепонем. Входе заболевания также образуются неспецифические антитела *–* ***реагины****,* которые можно выявить в реакции флокуляции с кардиолипином, эстрагированным из бычьего сердца. Эта реакция применятся при диагностике сифилиса.

**Резистентность к факторам внешней среды**. *T.pallidum чувствителен к высыханию, солнечным лучам ,дезинфицирующим веществам.* При нагревании мгновенно гибнет. В препаратах крови при температуре 40Св течение 24 часов сохраняет жизнеспособность. При неблагоприятных условиях образует цисты и L-формы.

**Факторы патогенности**. *Патогенность T.pallidum* связана с активной подвижностью. Благодаря этому возбудитель с легкостью проходит через кожные покровы и слизистые оболочки, и проникают в кровоток. **Рецепторы к фибронектину и коллагену** oбеспечивают его адгезию к интерстициальной ткани. Не образует токсин. **Липопротеины** участвуют в развитии иммунопатологических процессов.

**Источник инфекции и пути передачи.** В естественных условиях болеет только человек. Заражение происходит, как правило, контактно-половым, реже – контактно-бытовым путями. При беременности инфицирование сифилисом происходит трансплацентарным путем (от матери плоду), в результате наступает внутриутробная гибель или ребенок рождается с признаками сифилиса. Возможно заражение в результате переливания крови, в особенности при переливании свежих образцов.

**Патогенез и клинические проявления сифилиса.** Входными воротами инфекции являются кожные покровы и слизистые оболочки. Возбудитель может проникать через неповрежденную кожу, через микротравмы слизистых оболочек или кожных покровов, и размножаться в тканях и частично в регионарных лимфатических узлах. Сифилис – заболевание с циклическим течением, протекает в несколько периодов.

**Первичный период сифилиса.** В связи с тем, что при сифилисе основание язвы имеет твердую консистенцию, ее назвали *«твердый шанкр»* (франц., *chancre –* рана). Твердый шанкр развивается в результате реактивного васкулита, который сопровождается массивной гибелью эпителиальных клеток вследствие закупорки микрокапилляров. Плотная консистенция шанкра является следствием продуктивного инфильтративного процесса с участием лимфоцитов и плазматических клеток. Гноя в ране нет, дно раны чистое с лаковой поверхностью, края зазубрены. В связи с тем, что в шанкре содержится большое количество спирохет, пациенты в этот период наиболее заразны. Несмотря на то, что через некоторое время происходит заживление твердого шанкра, через 2-10 недель начинается вторая стадия заболевания

**Сифилис – II период.** На различных участках тела, в том числе на руках и ногах, развивается красная *макулопапулезная сыпь,* на аногенитальных органах и слизистой оболочке полости рта появляются бледные кондиломы. В этот период возможно развитие сифилитического менингита, хориоретинита, гепатита, иммунокомплексного типа нефрита, периостита. Поскольку сыпь богата спирохетами, в этот период пациенты являются заразными. Хотя эти элементы заживают самостоятельно, они могут вновь появиться через 3-5 лет, однако после этого периода начинается третичный период заболевания. Примерно в 30% случаев может происходить самопроизвольное излечение, в 30% случаев заболевание сохраняется в латентной форме и выявляется только в положительных серологических реакциях. В остальных случаях заболевание переходит в третичный период. Следует отметить, что как первичный, так и вторичный период сифилиса, могут протекать бессимптомно – иметь субклиническое течение. В таких случаях болезнь проявляется признаками третичного периода.

**Сифилис – III период.** Проявляется образованием сифилитических гранулем – *гумм* на коже, костях и в печени. Они являются результатом развития иммунопатологического процесса и ответной реакции на трепонемы, сохраняющиеся в организме. Гуммы имеют тенденцию распадаться с последующими общими деструктивными изменениями в поврежденных органах и тканях. Могут наблюдаться дегенеративные изменения в центральной нервной системе (менинговаскулярный сифилис, парезы, спинная сухотка – tabes dorsalis), а также изменения в сердечно-сосудистой системе, проявляющиеся аортитом, аневризмой аорты, недостаточностью аортального клапана.На третьем этапе заболевание не заразно, в некоторых случаях трепонемы обнаруживаются в центральной нервной системе.

**Врожденный сифилис.** Трепонемы, циркулирующие в крови больной матери, во втором триместре беременности могут инфицировать плод через плаценту. Исход внутриутробной инфекции зависит от количества трепонем, инфицировавших плод. Высокая инфицирующая доза может привести к мертворождению и абортам. В иных случаях возникает врожденный сифилис. Поскольку возбудитель через плаценту попадает непосредственно в кровоток плода, симптомы врожденного сифилиса схожи с симптомами второй стадии сифилиса у взрослых. Очаги поражения на коже богаты трепонемами, внешность новорожденного похожа на старческую – кожа лица морщинистая, наблюдается нехватка веса и гипотрофия. Иногда наблюдаются *триада Гетчинсона* – кератит, бочкообразные зубы, признаки глухоты.

**Иммунитет.** Как и при всех венерических заболеваниях, иммунитет, который формируется после сифилиса, не защищает от рецидивов. В случае повторного заболевания сифилисом твердый шанкр не наблюдается, заболевание начинается с признаков второго периода. Поэтому иммунитет, сформированный во время сифилиса, иногда называют и «иммунитетом к шанкру».Суперинфекция T. pallidum невозможна как в активном периоде заболевания, так и при латентном сифилисе. Однако после эффективного лечения, переболевшие повторно могут заболеть сифилисом. Гуморальный иммунитет проявляется образованием в организме антител к возбудителю. Образуются ***неспецифические антитела (нетрепонемальные антитела)***, называемые «реагинами», представленные IgM- и IgG-антителами, образующимися первично к липоидному антигену возбудителя. По мере уменьшения числа трепонем в организме титр этих антител уменьшается. Позже образуются ***специфические антитела*** *(****трепонемальные антитела***) к белковому антигену. Независимо от наличия трепонем в организме, они сохраняются в течение длительного времени. Клеточный иммунитет – ***реакция гиперчувствительности замедленного типа***, обусловливает образование сифилитических гумм.

**Микробиологическая диагностика.** Используют различные методы исследования в зависимости от стадии заболевания, в основном – микроскопический и серологический.*Микроскопический метод.*  Основывается на выделении трепонем из отделяемого твердого шанкра при первичном и высыпаний - при вторичном сифилисе. Нативные препараты исследуют в темнопольной микроскопии, препараты, окрашенные методом Гимзы и серебрением – под световым микроскопом. Следует помнить, что *через несколько часов после начала лечения антибиотиками трепонемы микроскопически не выявляются.* Трепонемы также могут быть выявлены при помощи реакции иммунофлюоресценции. Для этого мазки, обработанные антитрепонемными антителами, меченными флюорохромами, исследуют под люминесцентным микроскопом. Серологический метод исследования направлен на выявление трепонемальных и нетрепонемальных антител в сыворотке больного.

**Исследование нетрепонемальных антител**. В качестве антигена чаще всего используется кардиолипин, полученный из сердечной мышцы быка. Очищенный кардиолипин с химической точки зрения представляет собой дифосфатидилглицерин. Добавление лецитина и холестерина ускоряет реакцию кардиолипинового антигена с неспецифическими реагентами. Чаще всего используют тест VDRL (англ., *veneral disease research laboratory*) и тест RPR (англ., *rapid plasma reagin*), иногда тест TRUST (англ., *toluidine red unheated serum test*). Принцип этих тестов основан на преципитации (флокуляции) кардиолипинового антигена реагинами сыворотки пациента. Результаты теста VDRL оцениваются микроскопически, а в тестах RPR и TRUST реакция преципитации видна невооруженным глазом, поскольку антигены адсорбируют на цветные частицы.

RPR-тест положителен при высоких титрах, начиная со 2-3-й недели заболевания, особенно на второй стадии заболевания. Эти тесты отрицательны через 6-18 месяцев после эффективного лечения сифилиса. Тест RPR может быть поставлен и со спинномозговой жидкостью пациента, и в этом случае он положителен, начиная с 4-8-й недели заболевания. Реагины не могут преодолеть гематоэнцефалический барьер, поэтому предполагается, что эти антитела также образуются и в центральной нервной системе. Тест RPR может оказаться положительным примерно у 1% здоровых людей, кроме этого, при малярии, проказе, кори, инфекционном мононуклеозе, коллагенозах (системной красной волчанке, ревматоидном полиартирите и др.), а также после вакцинации (ложноположительная реакция).

**Исследование трепонемальных антител**. Выявление трепонемальных антител в сыворотке крови считается специфическим тестом. Они имеют высокую чувствительность и специфичность и относятся к **подтверждающим тестам** с диагностической точки зрения.

**Реакция непрямой иммунофлюоресценции**. Реакцию непрямой иммунофлюоресценции проводят с использованием убитых T. pallidum, сыворотки крови пациента и меченой антииммуноглобулиновой сыворотки. Если в сыворотке крови присутствуют антитела к трепонемам, они взаимодействуют с трепонемами, и полученный комплекс, в свою очередь, связывается с меченными антителами к человеческим иммуноглобулинам , что можно наблюдать в виде свечения в люминесцентном микроскопе. Эта реакция отличается высокой чувствительностью и специфичностью, положительна с первого периода заболевания и обычно положительна даже через много лет после эффективного лечения сифилиса. Поэтому эта реакция не используется для оценки эффективности лечения.

**Реакции пассивной агглютинации (гемагглютинации).** Используют реакции гемагглютинации *T. pallidum* (TPHA) и микрогемагглютинации *T. pallidum* (MHA-TP).Эритроциты, на поверхности которых адсорбируют антигены *T. pallidum*, вступают в реакцию с разбавленной сывороткой пациента, содержащей антитела, в результате происходит агглютинация эритроцито. Чувствительность и специфичность этих тестов так же высока, как у реакции непрямой иммунофлюоресценции.

**Лечение.** *T. pallidum* чувствителен к бензилпенициллину (пенициллин G), его концентрация в 0,003 ТИ/мл обладает антитрепонемальной активностью. Поэтому пенициллин является препаратом выбора при лечении сифилиса. Заболевание продолжительностью менее одного года можно лечить бензатин-пенициллином или бициллином – вводя внутримышечно 3 раза в неделю. В некоторых случаях также используются эритромицин и тетрациклин.

***Род Borrelia.*** К роду Borrelia относятся спирохеты размером 10-30 х 0,3-0,6 мкм с 3-10 крупными неравномерными завитками. Двигательный аппарат состоит из 15-20 жгутиков. Интенсивно окрашиваются анилиновыми красителями, грамотрицательны, по методу Гимзы окрашиваются в сине-фиолетовый цвет. Темнопольная микроскопия позволяет легко выявить движущиеся спирохеты.

***Род Borrelia* (культивация).** Borrelia являются строгими анаэробами. Культивируются в сложных питательных средах, содержащих сыворотку, асцит, экстракты тканей в атмосфере 5-10% СО2, при температуре 20-370C, а также в желточном мешке куриных эмбрионов.

Род Borrelia включает в себя более 20 видов, большинство из которых не являются патогенными для человека. Некоторые из них выявляются в нормальной микрофлоре организма человека – в полости рта (*B. buccalis*), в слизистых оболочках гениталий (*B. refringens*). Патогенные для человека вида вызывают возвратный тиф (*typhus recurrentis*) и болезнь Лайма.

**Возбудители возвратного тифа.** *Эпидемический возвратный тиф – возбудитель B. recurrentis.* Источник инфекции – больные люди. Болезнь передается через вшей. Вши становятся заразными через 1-4 недели после высасывания крови у больного человека. Боррелиями заражаются при втирании гемолимфы раздавленных вшей в кожу при расчесывании в месте зуда. Эндемический возвратный тиф, являясь природно-очаговым зоонозным заболеванием, встречается спорадически, главным образом, в субтропических и тропических районах и вызывается многими видами боррелий. Среди них наиболее часто встречаются *B. duttoni* и *B. persica*. Боррелии, резервуарами которых в природе являются грызуны, передаются от больных животных людям через укусы клещей рода *Ornithodoros.* Возбудители находятся в слюне клещей и передаются трансовариальным путем от поколения к поколению.

**Патогенез возвратного тифа.** Инкубационный период заболевания составляет 5-10 дней. Попадая в организм, боррелии размножаются внутри фагоцитов и попадают в кровь, что опровождается лихорадкой, ознобом и сильными головными болями. Лихорадочный период (пирексия) длится 3-5 дней. В этот период антитела, образующиеся против возбудителей, лизируют их, в результате чего лихорадка спадает и начинается период болезни без лихорадки (апирексия) длительностью 4-10 дней. В период апирексии происходит образование резистентных к антителам боррелий, которые размножаются и снова попадают в кровь, и снова начинается лихорадочный период. В течение болезни фебрильные судороги могут повторяться 3-10 раз (с этим связано и название болезни).

**Микробиологическая диагностика**.

Основана на исследовании образцов крови, взятых во время лихорадочного периода. Возбудитель можно обнаружить ***микроскопически*** в толстых и тонких мазках крови, окрашенных по методу Гимзы.

* Дифференциацию возбудителей эпидемического и эндемического возвратного тифа можно провести посредством ***биологической пробы.*** Кровь, взятая у пациентов, вводится в брюшную полость лабораторных животных.
* Морские свинки чувствительны к возбудителям эндемического возвратного тифа, а белые мыши чувствительны к *B. recurrentis*.
* Через 2-4 дня в крови зараженных животных можно выявить возбудителей микроскопическим методом.

**Лечение и профилактика.**

* **Лечение.** Используются тетрациклин, эритромицин и пенициллин.
* **Профилактика.** Неспецифическая профилактика эпидемического возвратного тифа основана на борьбе с вшами, а эндемического возвратного тифа – на борьбе с клещами и грызунами в их естественной среде обитания.
* Специфическая профилактика не разработана.

**Возбудители болезни Лайма**

Болезнь Лайма - хроническая мигрирующая эритема или лаймоборрелиоз, является хронической инфекцией, сопровождающейся повреждением кожи, сердечно-сосудистой и нервной систем, артралгией и артритом. Заболевание в Америке вызывается *Borrelia burgdorferi*, а на Евразийском континенте – *B. garini* и *B. afzelii*.

**Морфобиологические особенности.** *B.burgdorferi,* является наиболее крупной боррелией, средние размеры которой составляют 20-30x0,2-0,3 мкм. По своим морфологическим и тинкториальным свойствам схожи с другими боррелиями, обладают 7-11 парами завитков и очень подвижны. Легко выявляются посредством анилиновых красителей и импрегнацией серебром. *B.burgdorferi* быстро развиваются в комплексных жидких средах (в среде *Barbour-Stoenner-Kelli*), с легкостью выделяются из участков эритемы на коже, из других материалов *B. burgdorferi* выделяются в редких случаях.

**Антигенная структура и факторы патогенности. *Osp-протеины*** (англ. *outer surface protein*) – белки наружной мембраны, состоящей из липопротеинов, обладают протективной активностью. В цикле развития антигенный состав борреллий подвергается изменениям. Во время культивирования на питательных средах и на поздних стадиях заболевания в организме людей преобладает антиген ***OspA***, а у клещей и на ранних стадиях заболевания в организме людей преобладает антиген ***OspC***. Osp-белки обеспечивают адгезивную способность борреллий к клеткам-хозяевам. В результате взаимодействия боррелий с макрофагами секреция цитокинов (ИЛ-1 и др.) индуцирует воспалительные процессы. OspA-белок участвует в развитии иммунопатологических реакций, приводящих к развитию артритов.

**Экология, источники инфекции и пути заражения.** В естественных условиях возбудители в основном встречаются у мелких грызунов, особенно у лесных мышей. Клещи рода *Ixodes* заражают людей через слюну при укусе, или при срыгивании содержимого средней кишки.

**Патогенез и клинические проявления болезни Лайма**. Попавшие в организм со слюной клещей боррелии, в течение инкубационного периода, мигрируют в окружающие ткани, что приводит к возникновению на коже характерной мигрирующей эритемы (*erythema migrans*). Подобно другим спирохетозам, болезнь Лайма также обладает **стадийным течением**. ***Первая стадия*** характеризуется гриппоподобными симптомами, лимфаденитом, миалгией и образованием быстрорастущей кольцевидной эритемы – мигрирующей эритемы в месте укуса клеща. ***Вторая стадия*** сопровождается артралгией и артритом, менингитом, параличом лицевого нерва, радикулопатией, а также миоперикардитом через 1-4 недели после начала заболевания. ***Третья стадия*** проявляется развитием хронических процессов на коже, в нервной системе и суставах через несколько месяцев после начала заболевания.

**Микробиологическая диагностика.**

* Симптоматическое заболевание может быть распознано по эритеме на коже. При отсутствии кожных симптомов, а также на более поздних стадиях заболевания используются микробиологические методы диагностики.
* В качестве материала для исследования берутся биоптаты кожи, взятые с области эритемы, синовиальная жидкость, спинномозговая жидкость (ликвор), сыворотка крови. В зависимости от стадии заболевания используются различные методы. В этих материалах *B. burdorferi* можно выявить с помощью ПЦР.
* Серологические тесты проводятся, начиная со второй стадии заболевания. Антитела (IgM и IgG) к возбудителю в сыворотке крови могут быть определены с помощью ИФР, ИФА и иммуноблоттинга.
* Антитела к возбудителю в организме образуются постепенно. Острая фаза заболевания серопозитивна только в 30-40% случаев, через 2-4 недели серологические реакции положительны у 60-70% пациентов. Через 4-6 недель антитела IgG к *B. burdorferi* выявляются у 90% больных. Хотя титр антител после лечения постепенно уменьшается, он остается в сыворотке крови пациентов годами.

**Лечение.** Этиотропное лечение доксициклином или амоксициллином проводится в течение 20-30 дней. Доксициклин более эффективен. Хорошие результаты при артрите дает применение больших доз пенициллина. **Профилактика.** Неспецифическая профилактика состоит из мер по борьбе и защите от клещей. Специфическая профилактика не разработана.

***Род Leptospira***

**Таксономия**.Лептоспиры относятся к семейству *Leptospiraceae*, роду *Leptospira*. Их традиционная классификация основана на их биохимических и серологических особенностях.Род *Leptospira* включает патогенные вид *L.interrhogans* и непатогенный вид *L.biflexa*. Вид *L.interrhogans* насчитывает более 200, а *L.biflexa –* более 60 серотипов. В отличие от других микроорганизмов, серотипы лептоспир имеют видовые названия. Например, *L.bovis, L.grippotyphosa, L.hebdomadis, L.icterohaemorrhagiae, L.mitis, L.pamona* и *L. interrhogans* являются одними из наиболее распространенных серотипов.

**Морфобиологические особенности.** Лептоспиры представляют собой тонкие спирохеты длиной 5-15 мкм и толщиной 0,1-0,2 мкм с 20-40 завитками. Один из концов часто изгибается, образуя крючок. Двигательный аппарат состоит из жгутиков, расположенных на обоих полюсах клетки. В препаратах трудноразличимы, т.к. слабо окрашиваются в розовый цвет по методу Гимзы. Хорошо окрашиваются при импрегнации серебром. Активную подвижность лептоспир можно наблюдать в темном поле и фазово-контрастной микроскопии нативных препаратов.

**Культуральные свойства**. Лептоспиры культивируют в аэробных условиях на жидких и полужидких средах (*Fletcher, Stuart* и др. среды) с добавлением сыворотки при 28-300 С. Они не образуют помутнения при выращивании (росте) на жидких питательных средах. Через 1-2 недели на полужидких средах ближе к поверхности питательной среды образуется диффузная зона роста, а затем в участках среды, оптимально снабженных кислородом, наблюдается рост в виде кольца

**Антигенная структура.** Наружная мембрана *L. interrhogans* богата липополисахаридами (ЛПС). У различных штаммов наблюдается антигенное разнообразие ЛПС. Это разнообразие ЛПС лежит в основе серологической классификации *L. interrhogans*, обусловливает их разделение на многочисленные (более 200) серовары. Схожие по антигенной структуре серовары *L. interrhogans* дают перекрестные реакции в серологических тестах.

**Экология, источник инфекции и** **пути заражения**. *L.interrhogans* широко распространены в природе, вызывают *лептоспироз* у людей и животных. Лептоспироз зоонозная инфекция. Источником инфекции являются в основном грызуны (синантропные и дикие грызуны), а также домашние животные (крупный рогатый скот, свиньи, собаки и т.д.). У животных инфекция протекает в виде нефрита, имеет хроническое течение, в основном без клинических проявлений; выделяя патогенные микроорганизмы с мочой, они загрязняют водоемы, пищу и почву. Люди заражаются в основном при контакте с водой, загрязненной экскрементами больных животных (предыдущее название болезни «водная лихорадка» было связанно именно с этим). Воротами для инфекции являются повреждения кожи и слизистых оболочек (слизистых оболочек рта и полости носа, конъюнктивы). Употребление воды, содержащей лептоспиры малозначно для заражения.

**Патогенез и клинические проявления лептоспироза**. Лептоспироз - острое инфекционное заболевание, характеризующееся лихорадкой, интоксикацией, повреждением капилляров печени, почек и центральной нервной системы. Патогенные микроорганизмы, проникающие в организм через кожу и слизистые оболочки, после 1-2-недельного инкубационного периода попадают в кровоток, вызывая бактериемию (спирохетемию), сопровождающуюся различными фебрильными реакциями. Возбудитель попадает в обильно снабжаемые кровью паренхиматозные органы (особенно почки и печень), где вызывает геморрагии и некроз, что приводит к гепатитам, проявляющимся нефритом и желтухой. Заболевание часто протекает двухфазно, повышение титра антител IgM, наступающее после улучшения после первой фазы, приводит к развитию «асептического менингита», проявляющегося интенсивными головными болями, менингеальными синдромами, плеоцитозом в спинномозговой жидкости. В то же время может наблюдаться повреждение кожи, мышц и глаз. В клинике заболевания чаще встречаются ***гепатиты***, которые сопровождаются увеличением фермента креатин фосфокиназы в сыворотке крови (при вирусных гепатитах количество этого фермента остается нормальным!).

* **Микробиологическая диагностика.** Для исследования берется кровь, спинномозговая жидкость, моча и сыворотка крови.
* *Микроскопический метод.* На ранних стадиях заболевания лептоспиры иногда можно выявить в тонком мазке крови, окрашенном методом Гимзы а также в темнопольном микроскопе. Темнопольная микроскопия осадка мочи также позволяет выявить возбудителя.
* ***Бактериологический метод.*** Культуру возбудителя можно получить и идентифицировать путем культивирования на полужидкой среде (Флетчера, Стюарта и др.) образцов свежей крови, мочи, а также спинномозговой жидкости больных. Лептоспиры развиваются постепенно, культуру можно получить только через 1-2 недели. Для идентификации используется *реакция микроагглютинации*. Реакция представляет собой реакцию агглютинации на стекле в присутствии специфических антител к серотипам *L. interrhogans*, результат которой оценивается микроскопически. Положительная реакция сопровождается агглютинацией лептоспир – образованием конгломератов в виде «паучков».
* **Биологическая проба** считается чувствительным методом в диагностике лептоспироза. Сыворотка крови или моча пациента вводится внутрибрюшинно мышам и морским свинкам. Через несколько дней лептоспиры можно выявить в перитонеальной жидкости. Через 1-2 недели во внутренних органах погибших животных выявляются геморрагические поражения.
* ***Серологический метод.*** При лептоспирозе титры агглютинирующих антител на 5-8 неделе болезни достигают максимума (1: 10000 и выше). Для выявления этих антител используется реакция микроагглютинации с использованием контрольных (референсных) штаммов лептоспир. Реакция очень чувствительна, и при использовании соответствующих серотипов она также обладает высокой специфичностью.

 - Для определения антител также используются реакция непрямой гемагглютинации и ИФА.

**Лечение.** Лечение легких форм заболевания проводится пероральным использованием доксициклина, ампициллина или амоксициллина. При лечении тяжелых форм пенициллин или ампициллин назначают внутривенно.

**Профилактика.** *Неспецифическая профилактика* включает борьбу с грызунами, вакцинацию сельскохозяйственных и домашних животных и зооветеринарные меры. При эпидемиологических показаниях проводится *специфическая профилактика* термически обработанной инактивированной корпускулярной вакциной, состоящей из различных серотипов возбудителя.