**Занятие 10**

**Микробиологическая диагностика заболеваний, вызываемых хламидиями и микоплазмами**

**Хламидии**

Хламидии относятся к порядку *Chlamydiales* , семейству *Chlamydaceae*, роду *Chlamydia/* Различают три вида хламидий - *C.trachomatis, C.psittaci* , *C.pneumoniae,- вызывающих заболевания у человека.* Согласно последней классификации, семейство *Chlamydaceae подразделяют на два рода:* *Chlamydia* и *Chlamidophila.* Род *Chlamydia представлен видом*  *C.trachomatis*, в род *Chlamidophila* включены виды *C.psittaci* и *C.pneumoniae*

**Морфо-биологические свойства.** *Свое название хламидии получили от греч. chlamyda* – мантия, так как в клетке хозяина, проходя уникальный цикл развития, образуют внутриклеточные включения, окруженные оболочкой, напоминающей мантию. Жизненный цикл развития хламидий характеризуется чередованием морфологически различных форм существования – элементарных и ретикулярных телец.

**Репродукция хламидий.** Размножение хламидий происходит в клетках, преимущественно эпителиальных. Элементарные тельца попадают в клетки-мишени путем эндоцитоза. Размножение заканчивается транформацией элементарных телец в ретикулярные. Ретикулярные тельца являются вегетативной формой хламидий, могут быть овоидной, полулунной формы и крупнее элементарных телец (0,3х1,5 мкм). Они располагаются внутриклеточно около ядра и окрашиваются по Романовскому-Гимзе в голубой или фиолетовый цвет. Ретикулярные тельца многократно делятся бинарным делением, затем превращаются в элементарные тельца Цикл развития хламидий продолжается 1-2 дня, завершается гибелью клетки хозяина и выходом элементарных телец.

 **Характеристика хламидий.**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Признаки** | ***Chlamydia trachomatis*** | ***Chlamydia pneumoniae*** | ***Chlamydia psittasi*** |
| Морфология элементарных телец | Округлой формы | Грушевидной,округлой формы  | Округлой формы |
| Форма внутриклеточных включений | Шаровидная, имеет вакуоль | Шаровидная, компактная | Крупные,полиморфные, компактная |
| Внутриклеточные включения, содержащие гликоген | **+** | **-** | **-** |
| Чувствительность к сульфаниламидам | **+** | **-** | **-** |
| *Chlamydia pneumoniae* ilə DNT hоmоlоgiyası | <10% | 100% | <10% |
| Серовары | 15 (A, B, Ba, C, D-K, L1, L2, L3) | 1 | 1 |
| Естественный хозяин  | Человек | Человек | Птицы |
| Вызываемые заболевания | Трахома и паратрахома;Урогенитальный хламидиоз и пневмония новорожденных; Венерическая лимфогранулема | Пневмония,острые респираторные инфекции,атеросклероз, саркоидоз,бронхиальная астма  | Орнитоз(пситтакоз)  |

**Культивирование.** Поскольку хламидии являются облигатными внутриклеточными паразитами, их можно размножать только в живых клетках. Культивируются хламидии в желточном мешке развивающихся куриных эмбрионов, организме чувствительных животных и в культуре клеток при температуре 350C. Больше всех используют культуру клеток McCоy. *C.pneumoniae лучше размножается в культуре клеток типа*  Hep-2.

**Антигенная структура.** Хламидии имеют родоспецифический термостабильный антиген –липополисахарид, находящийся в клеточной стенке хламидий. *Видоспецифический или серовароспецифический антиген – главный белок наружной мембраны*. По своей антигенной структуре некоторые виды хламидий делятся на серовары.

**Факторы патогенности.** Факторы патогенности хламидий связаны с белками наружной мембраны, обладающие адгезивными свойствами. Эти адгезины обнаруживают только у элементарных телец. Белки наружной мембраны обладают антифагоцитарными свойствами, так как способны подавлять слияние фагосомы с лизосомой. Эндотоксины представлены липополисахаридом хламидий.

*В настоящее время известно 15 сероваров C.trachomatis* - A, B, Ba, C, D-K, L (L1, L2, L3), которые вызывают разные нозологические формы. Серовары A, B, Ba и C вызывают трахому; Серовары D-K вызывают урогенитальный хламидиоз. Серовары L1, L2, L3 вызывают венерическую лимфогранулему .

**Трахома**

Хроническое инфекционное заболевание, характеризующееся воспалением конъюнктивы и роговицы, и приводящее к формированию грубых рубцов. *Заболевание вызывают C.trachomatis сероваров* A, B, Ba, и C. Возбудитель проникает в эпителий конъюнктивы и роговицы, где размножается, разрушая клетки. Развивается фолликулярный кератоконъюнктивит. В запущенных случаях вся конъюнктива больного глаза усеяна зернышками тесно прилегающими друг другу, что напоминает «лягушачью икру».Название этой болезни в переводе с греч. «*trachys*» означает «шероховатый, неровный».

**Микробиологическая диагностика трахомы.** Исследуют соскобы с конъюнктивы. Препараты окрашивают по Романовскому-Гимзе, где при микроскопии обнаруживаются цитоплазматические включения фиолетового цвета с красным центром, расположенные около ядра – тельца Хальберштедтера-Провачека. Для выявления специфического хламидийного антигена в пораженных клетках применяют РИФ.

**Урогенитальный хламидиоз.**

* Одно из самых распространенных заболеваний, вызываемых *C.trachomatis* сероваров D-K. Заболевание сопровождается поражением мочеполовой системы, передается половым путем. ***У мужчин при урогенитальном хламидиозе*** поражается эпителий уретры и клинически проявляется развитием уретрита. Урогенитальный хламидиоз часто называют «негонококковый уретрит», так как у больных отмечаются симптомы, напоминающие гонорею: зуд, выделения, боль при мочеиспускании.
* ***У женщин при урогенитальном хламидиозе*** первоначально поражается шейка матки, что приводит к цервициту. Восходящая инфекция клинически проявляется развитием уретрита, эндометрита, сальпингита. Воспалительный процесс в органах малого таза приводит к образованию спаек и рубцов, следствием чего является развитие непроходимости маточных труб у женщин и бесплодия.

**Урогенитальный хламидиоз (синдром Рейтера*).*** В некоторых случаях урогенитальный хламидиоз может осложниться развитием синдрома Рейтера. Синдром Рейтера сочетает в себе триаду последовательных признаков: ***уретрит, конъюнктивит (иридоциклит или увеит) и реактивный артрит.*** Поражение глаз при урогенитальном хламидиозе отмечается спустя 1-4 недели.

В основе патогенеза синдрома Рейтера лежит аутоиммунный механизм, обусловленный «белком теплового шока» хламидий, который схож по своему аминокислотному составу с человеческим. Накапливаясь в организме человека, этот белок может запускать аутоиммунные процессы, приводящие к развитию реактивных артритов, уретриту и конъюнктивиту.

**«Конъюнктивит бассейнов».** Возбудители урогенитального хламидиоза могут попасть на слизистую оболочку глаз здоровых лиц при купании в нехлорированных бассейнах, в результате чего развивается кератоконъюнктивит («конъюнктивит бассейнов»). Хламидийный конъюнктивит также может развиться в результате аутоинфекции (инокуляция выделений уретры в конъюнктиву). Хламидийный конъюнктивит обычно является односторонним процессом и носит название «паратрахома», или «конъюнктивит с включениями».

**Инфекционные заболевания новорожденных, вызываемые *C.trachomatis***

Новорожденные могут заражаться от больной матери при прохождении через родовые пути. У младенцев через 3 месяца после рождения может развиться атипичная **пневмония хламидийной этиологии**. *C.trachomatis* попадает в конъюнктиву новорожденным детям от больной матери. Через 7-12 дней болезнь протекает с явлениями гнойно-слизистого конъюнктивита –конъюнктивит новорожденных с внутриклеточными включениями.

**Диагностика урогенитального хламидиоза (материалы исследования)**

* Материалом для исследования служат соскобы с эпителия уретры (у мужчин), влагалища, шейки матки, которые забирают при помощи специальных «щеток», а также при помощи дакроновых или ватных тампонов.
* При конъюнктивите исследуют соскобы с эпителия конъюнктивы.
* Основным условием взятия соскоба является наличие в нем большого числа эпителиальных клеток, так как хламидии в основном выявляются внутри клетки.
* РИФ, используемая при диагностике урогенитального хламидиоза позволяет обнаружить антигены хламидий в эпителии конъюнктивы и мочеполового тракта.
* С этой целью для определения видоспецифичных антигенов хламидий (белов наружной мембраны) используют моноклональные антитела, Чувствительность метода 80-90%, специфичность приближается примерно к 100%.
* ***В препаратах окрашенных по Романовскому-Гимзе обнаружить хламидии удается крайне редко.***
* РИФ позволяет определить внутриклеточные включения в однослойных **культурах клеток**, заражаемых патологическим материалом через 2-3 дня инкубации при температуре 35-37С. Наиболее часто используют культуры клеток типа McCоу.
* Антитела в сыворотке крови больного можно обнаружить с помощью ИФА. Однако специфические антитела остаются в сыворотке переболевших людей в течение длительного времени.
* Этот метод исследования может быть использован для обнаружения İgM против *C.trachomatis* при диагностике пневмонии новорожденных.
* Чаще всего используется ***ПЦР.***

**Лечение урогенитального хламидиоза.** Применяют тетрациклин или доксициклин. Наиболее эффективен азитромицин. Одновременное лечение половых партнеров является важным условием терапии. Лечение конъюнктивитов хламидийной этиологии (в основном местное) проводят с помощью антибиотиков (тетрациклин, эритромицин).

**Венерическая лимфогранулема (*Lymphоgranulоma venereum*)**

Заболевание, передающееся половым путем, характеризуется развитием гнойных лимфаденитов в паховой области и иногда симптомами генерализации инфекции **Венерическая лимфогранулема** вызывается C.trachomatis сероваров L (L1, L2, L3) . Заболевание встречается преимущественно в странах с тропическим климатом – в Юго-восточной Азии, Центральной и Южной Америке. Входные ворота инфекции – слизистая оболочка половых органов. В наружных половых органах, прямой кишке, анусе образуются небольшие папулы, эрозии, язвочки, заживающие через несколько дней. Через 2-6 недель развивается воспаление лимфатических узлов(лимфаденит) с характерными поражениями паховых, тазовых и бедренных лимфатических узлов и проявляется увеличением лимфоузлов, мышечными болями. В воспалительный процесс вовлекается прилегающая соединительная ткань, формируются плотные, спаянные с окружающей тканью узлы (бубоны). Вскоре бубоны вскрываются, образуя долго незаживающие фистулы с желтовато-зеленым отделяемым.

**Венерическая лимфогранулема (микробиологическая диагностика).** Получение культуры возбудителя, а также ее морфологическую и серологическую идентификацию можно провести путем культивирования бубонного содержимого, а также гноя в ***культуре клеток McCoy***. Выявление антител в сыворотке крови больного проводят в РСК со 2-4-й недели заболевания (диагностический титр – 1:64). Внутрикожная проба с аллергеном хламидий в этот период дает положительный результат (***реакция Фрея***).

***Clamydia psittaci***

*C.psittaci* является возбудителем орнитоза. У человека вызывает тяжелую пневмонию с геморрагическими проявлениями.

* Заболевание было описано 1875 году Т. Юргенсом и названо «пситтакоз» (от греч. *psittakos* -попугай), так как возникло после контакта с попугаями.
* Позже было замечено, что заражение возможно не только от попугаев, но и от других птиц, поэтому получило название «орнитоз» (от греч. *ornis* - птица).

**Орнитоз (источник инфекции и пути заражения)**

Заболевание передается воздушно-капельным и воздушно-пылевым путями. Заражение иногда может происходить алиментарным путем – при употреблении в пищу мяса птицы, недостаточно хорошо обработанного термически. Также возможна передача возбудителя через грязные руки – контактный путь передачи инфекции. Эпидемические вспышки орнитоза чаще встречаются среди птицеводов и животноводов. Заболевание редко передается от человека к человеку, так как количество возбудителя, выделяемого больными очень мало, но все же, протекает в более тяжелой форме, если источником инфекции является человек.

**Патогенез и клинические проявления орнитоза.** Возбудители попадают в организм через слизистые оболочки верхних дыхательных путей, проникают в эпителий бронхов, бронхиол и альвеол, где и размножаются. Развивается воспаление. Хламидии попадают в кровь (бактериемия), разносятся по всему организму, поражая паренхиматозные органы (печень, селезенку). Сопровождается некротическими гранулематозными поражениями с множественными геморрагиями в легких и лимфатических узлах. Инкубационный период составляет около 10 дней. Заболевание начинается остро – повышение температуры, признаки интоксикации. Через 8-12 дней развивается пневмония, очаг поражения охватывает нижние доли легких, в частности правого. Орнитоз иногда напоминает грипп, микоплазменную или вирусную пневмонию.

**Микробиологическая диагностика.**

* Основным методом диагностики орнитоза является серологический метод (РСК, ИФА) для определения *специфических антител в сыворотке* крови больного.
* Диагностическое значение имеет увеличение, по крайней мере, в четыре раза титра антител в сыворотке крови, забранной с недельным интервалом, а также выявление в ней высоких титров IgM.
* Выявление возбудителя в мокроте, крови, а также в тканях посредством ***ПЦР*** характеризуется относительно высокой чувствительностью по сравнению с культуральными и серологическими методами.

***Chlamydia pneumoniae***

*C.pneumoniae* вызывает у человека респираторные заболевания. Путь передачи – воздушно-капельный. Обладая тропизмом к эпителию дыхательных путей, эти бактерии вызывают воспаление верхних отделов респираторного тракта и легких. Внедряясь в легочную ткань и размножаясь, хламидии вызывают гибель клеток и тяжелое воспаление легких. Инфекции, вызываемые *C.pneumoniae* проявляются в виде фарингита, синусита, отита и атипичной пневмонии. Хламидийные пневмонии клинически неотличимы от поражений легких, вызываемых *Mycоplasma* *pneumоniae*. Возбудителем пневмонии в молодом возрасте примерно в 5-20% предполагается *C.pneumoniae*.

**Микробиологическая диагностика инфекций, вызываемых *C.pneumoniae***

* Для выявления внутриклеточных включений в материале из зева, его обрабатывают циклогексимидом и культивируют культуре клеток McCoy при 35-37 ° C в течение 3 дней. Далееприпомощи РИФ с использованием моноклональных антител, меченых флюорохромом к обнаруживают внутриклеточные включения образованные *C.pneumoniae*.
* Наиболее чувствительным методом выявления специфических антител в сыворотке крови пациентов является ***ИФА***. Во время первичной инфекции IgM обнаруживается примерно через 3 недели, а IgG – через 6-8 недель.
* Хламидии также можно обнаружить в патологических материалах при помощи ***ПЦР.***

**Микоплазмы**

Микоплазмы (*mykes*-гриб, *plasma*-нечто имеющее форму) прокариоты, не имеющие клеточной стенки. Микоплазмы относятся к классу *Mоllicutes* (*mоllis*-мягкий, *cutis*-кожа; мягкокожие) порядка *Mycоplasmatales*. Патогенными для человека являются виды родов *Mycоplasma* и *Ureaplasma*.

**Характерные признаки микоплазм**

* Отсутствие клеточной стенки определяет полиморфизм микоплазм;
* Микоплазмы покрыты трехслойной цитоплазматической мембраной, содержащей стеролы (добавление к питательной среде холестерина ускоряет рост микоплазм);
* Микоплазмы устойчивы к бета-лактамным препаратам, подавляющим синтез клеточной стенки;
* Способны расти на питательных средах, при внесении в среду специфических иммунных сывороток рост микоплазм ингибируется;
* Обладают тропизмом к клеточной мембране млекопитающих

В связи с отсутствием клеточной стенки микоплазмы полиморфны. В экспоненциальной фазе роста они имеют сферическую или овальную форму. Грамотрицательны, хорошо окрашиваются по Романовскому-Гимзе , различают подвижные и неподвижные виды.

**Культуральные свойства.**

* Факультативные анаэробы, требовательны к условиям культивирования.
* Многие штаммы микоплазм растут на средах, содержащих 30% дрожжевого экстракта , а также экстракты говяжьего сердца и мозга, лошадиную сыворотку при температуре 36-370C в течение 48-96 часов.
* На жидких средах не вызывают помутнения. На плотных средах образуют мелкие круглые колонии размером 20-500 мкм , напоминающие «яичницу-глазунью». За счет перекиси водорода на кровяном агаре образуют зоны альфа- и бета-гемолиза.

 **Биохимические свойства микоплазм, патогенных для человека**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Вид**  | **Гидролиз мочевины** | **Гидролиз аргинина** | **Образование кислоты при ферментации глюкозы**  | **Образование кислоты при ферментации маннозы** |
| **M. pneumoniae** | **-** | **-** | **+** | **+** |
| **M. hominis**  | **-** | **+** | **-** | **-** |
| **M. genitalium** | **-** | **-** | **+** | **±** |
| **M. fermentans** | **-** | **+** | **+** | **-** |

**Факторы патогенности**

* ***Адгезины*** входят в состав поверхностных антигенов и обусловливают адгезию на клетках хозяина.
* ***Экзотоксины*** идентифицированы у непатогенных для человека микоплазм - *M.neurolyticum* и *M.gallisepticum*. Мишенями их действия являются мембраны астроцитов.
* ***Эндотоксины*** выделены у многих патогенных микоплазм***.***
* ***Гемолизины*** встречаются у некоторых видов (*M.pneumonie)*
* ***Ферменты агрессии -*** фосфолипаза A , нейраминидаза, протеазы

**Болезни, вызываемые микоплазмами**

* **Респираторный микоплазмоз** – возбудитель *Mycoplasma pneumoniae.*
* ***Фарингит*** вызванный М. pneumoniae, сопровождается лихорадкой, гиперемией глотки и лимфаденитом, его трудно отличить от фарингита вирусного и бактериального происхождения.
* ***Трахеобронхит*** – характеризуется вялым течением, сопровождается общей слабостью, лихорадкой, головной болью и кашлем.
* ***Пневмония.*** Около 20% всех пневмоний вызваны M. pneumoniae. В большинстве случаев атипичная, имеет легкое течение по сравнению с другими бактериальными пневмониями. Интерстициальные и очаговые, в редких случаях наблюдаются сегментарные, долевые или смешанные пневмонии.
* Возбудителями ***урогенитального микоплазмоза*** являются M. hominis, M. genitalium и M. fermentans. Заболевание передается половым путем и характеризуется деструктивными воспалительными процессами в мочеполовом тракте.
* ***Микоплазменный артрит***. Основная роль в патологии суставов принадлежит виду *M.fermentans,* который встречается примерно в 40% случаев артрита. Примерно у 45% больных ревматоидным артритом выделяется *M.fermentans* (часто в сочетании с *M. arthridis*). Инфекции *M.fermentans* сопровождаются образованием антител к иммуноглобулинам IgG (***ревматоидный фактор***).

**Микробиологическая диагностика**

***При респираторном микоплазмозе*** исследуются мазки, взятые тампоном из носоглотки, мокрота и бронхиальный лаваж. ***При урогенитальных инфекциях*** исследуется моча, соскоб с уретры, матки, содержимое цервикального канала, материалы, полученные при лапароскопии, амниоцентезе, а также органы мертворожденных и абортированных плодов. При простатите исследуется секрет простаты, а при мужском бесплодии – сперма. При заборе материала соблюдают правила исследования при хламидиозах

* Для выявления антигенов к микоплазмам в мазках, приготовленных из материалов используется прямой и непрямой ***РИФ***.
* В последнее время стало возможным идентифицирование микоплазм в исследуемых материалах с использованием ***ПЦР***.
* Можно получить и идентифицировать культуру патогена путем культивирования исследуемого материала в ***элективных питательных средах.***
* ***Серодиагностика*** респираторного микоплазмоза основана на четырехкратном и большем увеличении специфических антител в сыворотке пациента.
* Поскольку патогены обладают слабыми антигенными и иммуногенными свойствами, определение антител при урогенитальных инфекциях имеет относительно меньшее диагностическое значение.

 ***Род Ureaplasma***

* Род *Ureaplasma* включает виды *U.urealiticum* и *U.parvuм*. Первоначально они входили в группу Т-микоплазм, названных вследствие способности образовывать мелкие (англ. *tiny ,* - маленький ) колонии, не превышающие в диаметре 10-30 мкм .
* Уреаплазмы по морфологическим признакам не отличаются от других микоплазм. В зависимости от размера различают мелкие (120-150 нм), средние (500-750 нм) и крупные морфологические типы. Уреаплазмы быстро растут в оптимальных средах (рН 6,5-7) при 37 ° С. Их можно культивировать, добавляя в среду до 1,5% мочевины.
* Не расщепляют углеводы, каталазаотрицательны, синтезируют гипоксантин. Продуцируют фосфолипазы,протеазы и уреазы, избирательно действующие на молекулу IgA.

**Болезни, вызываемые уреаплазмами**

Заражение уреаплазмами отмечается у 25-80% людей, ведущих активную половую жизнь, имеющих трех и более половых партнеров. Заражение уреаплазмозом происходит половым путем. Более половины ***негонококкных уретритов*** у мужчин вызваны *U. urealiticum*. Заболевание часто проявляется как ***уреаплазменный простатит.*** У женщин инфекция обычно протекает бессимптомно, но грибковые, паразитарные и бактериальные инфекции обостряют заболевание и приводят к развитию ***вагинитов, сальпингитов и циститов***. У женщин уреаплазмы могут попадать в верхние отделы половых путей посредством сперматозоидов, что приводит к нарушению фертильной функции, а колонизация эндометрия может привести к абортам и послеродовому сепсису. При проникновении уреаплазм в мочевые пути развивается ***острый уретральный синдром***. Хроническое воспаление мочевыводящих путей и фермент уреаза способствуют развитию ***мочекаменной болезни***.

* Исследуют мочу, 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.
* При заборе материала соблюдают те же правила исследования как и при хламидиозах.

Антигены уреаплазм в исследуемом материале выявляют с помощью прямого и непрямого метода РИФ.

* Выявить уреаплазмы в исследуемом материале возможно постановкой ПЦР
* Выделить чистую культуру возбудителя и идентифицировать ее можно путем ***культивирования*** исследуемого материала в соответствующих питательных средах.
* Уреаплазмы от прочих микоплазм дифференцируют по способности секретировать уреазу.