**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.

**Риккетсии**

В современной классификации все риккетсии включены в семейство *Rickettsiaceae*. По своим морфологическим и многим биологическим особенностям риккетсиоподобные микроорганизмы включены в семейство *Bartonellaceae*. В семейство *Rickettsiaceae* входят мелкие грамотрицательные бактерии рода *Rickettsia, Orientia, Ehrlichia* и *Coxiella*. За исключением возбудителя Q-лихорадки, все риккетсии являются облигатными внутриклеточными паразитами, которые заражают людей через укусы членистоногих. Вызывают у людей заболевания, называемые ***риккетсиозами***.

**Характеристика риккетсиозов**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Группы** | **Возбудитель** | **Болезнь** | **Источник инфекции** | **Вектор** |
| Группа сыпного тифа | *Rickettsia prowazekii* | Эпидемический (вшивый) сыпной тиф | Человек | Платяные вши |
| *Rickettsia typhi* | Эндемический (крысиный, блошиный) сыпной тиф | Крысы, мыши | Блохи |
| *Orientia tsutsugamushi* | Kустарная лихорадка | Грызуны | Краснобрюхие клещи |
| Группа пятнистых лихорадок | *Rickettsia rickettsii* | Пятнистая лихорадка скалистых гор | Грызуны | Клещи |
| *Rickettsia conorii* | Марсельская (Средиземноморская, Северо-африканская и пр. пятнистые лихорадки) | Грызуны, собаки | Клещи |
| *Rickettsia australis* | Квинслендская (Австралийская) клещевая лихорадка | Грызуны | Клещи |
| *Rickettsia akari* | Осповидный риккетсиоз | Грызуны | Клещи |
| *Rickettsia sibirica* | Северо-азиатский клещевой риккетсиоз | Грызуны | Клещи |
| *Rickettsia japonica* | Японская лихорадка | Клещи | Клещи |
| Группа Q-лихорадки | *Cохiella burnetii* | Q-лихорадка | Крупный и мелкий рогатый скот | Клещи |
| Группа *Ehrlichia* | *Ehrlichia chaffeensis* | Моноцитарный эрлихиоз | Олени, собаки, грызуны | Клещи |
| *Ehrlichia sennetsu* | Моноцитарный эрлихиоз | Млекопитающие | Рыбы |
| *Ehrlichia ewineii* | Гранулоцитарный эрлихиоз | Собаки | Клещи |
| *Anaplasma phagocytophilum* | Гранулоцитарный эрлихиоз | Мыши и другие грызуны | Клещи |

**Морфо-биологические особенности.** Риккетсии – это палочковидные или кокковидные микроорганизмы размером 0,3x1-2 мкм.Для риккетсий характерны плотные и слизистые микрокапсулы. Они неподвижны, не образуют спор, имеют фимбрии и пили. Все морфологические формы риккетсий имеют тройную клеточную стенку, цитоплазматическую мембрану, цитоплазматические включения, вакуоли и нуклеоиды. Нуклеоид состоит из 1-4 частиц. Клеточная стенка содержит пептидогликан, мурамин и диаминопимелиновые кислоты.

Риккетсии сыпного тифа и пятнистой лихорадки имеют липополисахарид (ЛПС). Поверхностные белки клеточной стенки – ***Omp-белки*** (по-английски, *outer membrane protein*) индуцируют гуморальный иммунный ответ, на основании этих белков риккетсии делятся на серотипы.Строение клеточной стенки риккетсий аналогично таковому грамотрицательных бактерий, хорошо окрашиваются по методу Гимзы и Здродовского, а также акридиновым оранжевым. При окрашивании методом Гимзы они приобретают вид пурпурно-голубых гранул, расположенных в протоплазме клеток. При окрашивании по методу Здродовского выглядят в виде светло-красных гранул на синем фоне

Риккетсии размножаются простым делением и не растут на искусственных питательных средах. Для их культивации используются развивающиеся куриные эмбрионы, клеточные культуры, членистоногие или чувствительные лабораторные животные.

**Антигенная структура.** Гликопротеины и ЛПС, входящие в состав клеточной стенки, обеспечивают антигенность риккетсий. Белки поверхности клеточной стенки – *Omp-белки* определяют антигенную специфичность риккетсий, на основании которой риккетсии делятся на серотипы. ЛПС некоторых риккетсий (например, возбудитель эпидемического сыпного тифа – риккетсии Провачека), сходны с протеями. Э. Вейль и А. Феликс определили, что сыворотка крови пациентов с сыпным тифом дает реакцию агглютинации со штаммами *Proteus vulgaris OX19*. Эта реакция, называемая реакцией **Вейля-Феликса**, в течение долгого времени использовалась в диагностических целях. Исследователи ошибочно полагали, что эта бактерия является причиной сыпного тифа. Позднее было установлено, что реакция Вейля-Феликса не была специфической для сыпного тифа, она была положительной так как риккетсии Провачека обладали схожими с протеями антигенами.

**Устойчивость к внешним факторам окружающей среды.**Большинство риккетсий вне организма хозяина и вектора (переносчика) могут сохраняться в течение короткого времени. Они неустойчивы к высоким температурам, ультрафиолетовым лучам и бактерицидным химическим агентам. Однако в высушенном состоянии они могут месяцами сохраняться в организме вектора (клещи, вши), а также в их выделениях. Возбудитель Q-лихорадки (*Coxiella burnetii*) более устойчив к воздействию факторов окружающей среды. Выживает после 30-минутной пастеризации при температуре 600С, также сохраняется в молоке в течение нескольких месяцев. Такая устойчивость объясняется способностью *Coxiella burnetii* образовывать ***эндоспороподобные структуры.***

**Факторы патогенности риккетсий.** Патогенность риккетсий обеспечивается в основном их клеточными структурами – пилями, белками наружной мембраны (клеточной стенки) – *Omp-белками* и *ЛПС*. Риккетсии Провачека и Риккетса содержат фосфолипазу А2, которая играет важную роль при инфицировании клеток. Риккетсии не вырабатывают экзотоксины.

**Патогенез риккетсиозов**. Риккетсии, попадающие в организм, прикрепляются к клеткам-мишеням с помощью пилей и *Оmp*-белков, а затем с помощью фосфолипазы А2 воздействуют на липиды внешней мембраны клетки-хозяина и через сформированные дефекты попадают внутрь клетки. В клетках-хозяевах формируется фагосома (вакуоль) с риккетсиями. Здесь риккетсии активно размножаются, и после разрыва вакуоли освобожденные риккетсии попадают в лимфу и кровь и, таким образом, распространяются по всему организму.

Процесс и механизм повреждения отдельных типов клеток-мишеней, зараженных риккетсиями в организме человека различны. Весьма характерно повреждение эндотелия сосудов риккетсиями. За исключением *C. burnetii*, риккетсии размножаются в эндотелии мелких кровеносных сосудов и вызывают ***васкулит***. Эти клетки набухают и некрозируются, закупорка тромбами кровеносных сосудов приводит к некрозу тканей. Хотя развитие васкулитов главным образом проявляется на коже, он также наблюдается во многих внутренних органах, что сопровождается нарушением кровообращения, синдромом диссеминированного внутрисосудистого свертывания и закупоркой сосудов. В результате агрегации лимфоцитов, полиморфноядерных лейкоцитов и макрофагов на стенках кровеносных сосудов серого вещества мозга развивается менингоэнцефалит с образованием ***тифоидных узлов***. Тифоидные узлы также могут формироваться и во внутренних органах – на сердечных сосудах и щитовидной железе. В некоторых случаях после перенесенного заболевания, риккетсии могут длительно сохраняться (персистировать) в организме, не вызывая патологического процесса. Эта способность обеспечивается переходом риккетсий в L-формы, антигенной мимикрией или за счет экранирования иммуноглобулинами. Например, патогенез болезни Брилля-Цинссера - рецидива сыпного тифа связан с длительной персистенцией возбудителя в лимфатических узлах.

**Возбудитель эпидемического сыпного тифа и болезни Брилля-Цинссера (*Rickettsia prowazekii*)**

Эпидемический или вшивый сыпной тиф является острым антропонозным заболеванием. Возбудитель болезни – *R.prowazekii* относится к роду *Rickettsia* семейства *Rickettsiaceae*. *R.provazekii* легко культивируется в организме вшей, в тканевых культурах, в желточных мешках развивающихся куриных эмбрионов. Размножается в цитоплазме чувствительных клеток.

**Источник инфекции и механизмы заражения эпидемического сыпного тифа**

Источником инфекции являются больные люди, болезнь передается от вшей. Вши становятся заразными через 4-5 дней после кровососания у больного человека. В течение этого времени риккетсии размножаются в кишечном эпителии вшей. После разрушения эпителиальных клеток риккетсии попадают в кишечную полость и выводятся с выделениями вшей. На месте укуса и кровососания развивается зуд. Заражение происходит в результате втирания фекалий зараженных вшей при расчесывании кожи. Заражение также может происходить в результате попадания в дыхательные пути пылевых аэрозолей содержащих высохшие фекалии инфицированных вшей

**Клинические проявления эпидемического сыпного тифа.** Инкубационный период составляет в среднем 1-2 недели. Эпидемический сыпной тиф проявляется лихорадкой, поражением эндотелия кровеносных сосудов жизненно важных органов (мозг, сердце, почки), розеолезно-петехиальной сыпью. Летальность без лечения - до 20%.

**Микробиологическая диагностика эпидемического сыпного тифа**

Диагноз осуществляется на основании клинико-эпидемиологических данных. Уточняется диагноз лабораторным исследованием на специфические антитела при помощи РСК, РНГА, ИФА и др.

**Лечение.** Этиотропное лечение проводят приемом доксициклина и препаратами тетрациклинового ряда. ***Неспецифическая профилактика*** осуществляется комплексом мер, включающих изоляцию завшивленных больных, дезинсекцию и дезинфекцию в очаге. ***Для специфической профилактики*** разработана химическая вакцина из растворимого антигена клеточной стенки риккетсий Провачека

**Болезнь Брилля-Цинссера** представляет собой **рецидив** ранее перенесенного эпидемического сыпного тифа**.** Болезнь получила название по фамилии нью-йоркского врача Н.Брилля, впервые описавшего данную разновидность риккетсиоза, впоследствии этот же риккетсиоз изучил Цинссер. Ранее эпидемический сыпной тиф встречался в районах, где происходила эпидемия. Болезнь Брилля-Цинссера связана с длительной персистенцией в лимфатических узлах возбудителя – *R.prowazekii*. Проявляется на фоне ослабления резистентности организма через 10-30 лет после перенесенного заболевания. Клинически проявляется легкой или средней степенью эпидемического сыпного тифа.

**Отличие болезни Брилля-Цинссера от первичного эпидемического сыпного тифа.** Для дифференцирования болезни Брилля-Цинссера от первичного эпидемического сыпного тифа исследуются антитела IgM и IgG к возбудителю. При эпидемическом сыпном тифе главным образом, появляются IgM, при болезни Брилля-Цинссера в основном обнаруживаются IgG антитела. Титр IgG достигает максимума в течение первых десяти дней болезни.

**Возбудитель эндемического (крысиного) сыпного тифа (*Rickettsia typhi*)** *относится к роду Rickettsia семейства* *Rickettsiaсеае*. Как и все риккетсии являются внутриклеточными паразитами. Морфологические, тинкториальные и прочие характеристики идентичны таковым у возбудителя эпидемического сыпного тифа.

**Источник инфекции и механизм заражения эпидемического сыпного тифа.** Эндемический сыпной тиф – зоонозное заболевание. Основным источником возбудителя в природе являются крысы и мыши, которые инфицируются посредством блох, вшей, и возможно клещей. В организм человека возбудитель попадает через укусы переносчиков (блохи, вши, клещи, возможен алиментарный или контактный пути передачи. Это природно-очаговое эндемичное заболевание, человек не является источником инфекции.

**Клинические проявления.** Первичный аффект на входных воротах инфекции отсутствует. Заболевание начинается после инкубационного периода продолжительностью 1-2 недели с острых головных болей, болей в суставах и лихорадки, достигающей 38-40°С к концу 1-й недели болезни. Для болезни характерны макуло-папулезные высыпания на поверхности тела. Рецидивов и повторных случаев болезни не зафиксировано. Летальность не превышает 2-3%.

**Микробиологическая диагностика эндемического сыпного тифа**. Диагноз устанавливается на основании клинико-эпидемиологических данных, подкрепляется исследованием сыворотки крови больного в серологических реакциях (РСК, РНГА, РИФ, ИФА и др.). Для дифференциации с эпидемическим сыпным тифом заражают самцов морских свинок кровью больных. *R.typhi* у морских свинок вызывает воспаление яичка – риккетсиозный периорхит (скротальный феномен). *R.prowazekii* у морских свинок вызывает только лихорадку. Дифференциация от эпидемического сыпного тифа основана на различии (в 2-4 раза) титров антител при постановке реакций с корпускулярными антигенами обоих возбудителей: *R.typhi* и *R.prowazekii* .

**Лечение и профилактика эндемического сыпного тифа**

**Лечение** проводят антибиотиками тетрациклинового ряда. ***Неспецифическая профилактика*** осуществляется комплексом дератизационных и дезинсекционных мероприятий в очагах. ***Специфическую профилактику*** в эндемических очагах проводят убитой вакциной.

**Возбудитель лихорадки Ку(*Coxiella burnetii)***

Заболевание получило название Ку лихорадки от начальной буквы английского слова «*query*»*,* означающей неясный, неопределенный. Рода и вид были названы в честь исследователей Кокса и Бернетта. *C.burnetii* представляют мелкие, полиморфные ланцетовидные микроорганизмы размером 0,2-0,4х0,4-1 мкм, могут иметь форму палочек или коккобацилл. Могут образовывать фильтрующиеся формы. Окрашиваются по Здродовскому и Романовскому –Гимзе в красный цвет. Как и бактериям им присущи R-S диссоциации. соответствующая, обладает изменчивостью. Возбудители образующие в естественных условиях фазу I, в результате длительных пассажей в тканевых культурах и куриных эмбрионах переходят в фазу II. Фаза I отличается от фазы II наличием ***структурных липополисахаридов*** в клеточной стенке.

*C.burnetii* являются облигатными внутриклеточными паразитами. Коксиеллы размножаются преимущественно в вакуолях и фаголизосомах клеток хозяина. Культивируются в желточном мешке куриного эмбриона при температуре 35°. Устойчивы к факторам внешней среды, в частности высушиванию и высокой температуре, при температуре 80-900C в течение 30 мин. сохраняют жизнеспособность. Пастеризация молока при температуре 600C в течение 30 мин. коксиелл не убивает. Они сохраняются в твороге, кефире и др. молочных продуктах. Устойчивы к действию желудочного сока, не погибают в 5% растворе формалина и в 1% растворе фенола. Образуют спороподобные формы, обеспечивающие высокую устойчивость к факторам внешней среды.

**Источник инфекции и механизмы заражения**. Источником инфекции являются животные. Существует несколько путей заражения человека:

-аэрогенное заражение – в результате вдыхания аэрозолей, содержащих возбудителя

- пероральное заражение – при употреблении в пищу мясных и молочных продуктов больных животных

-возможен трансмиссивный путь передачи при укусах клещей.

*C.burnetii*  в естественных условиях вызывают у крупного и мелкого рогатого скота, лошадей, собак, грызунов, а также птиц хронические заболевания*.* Риккетсии выделяются от больных животных с молоком, мочой и выделениями, а также с околоплодными водами во время отела.

**Патогенез лихорадки Ку** отличается от риккетсиозов. Возбудитель при проникновении в организм человека внедряется в кровь и лимфу , а затем в клетки тканей и органов. *Фагоцитированные C.burnetii не лизируются – за счет незавершенного фагоцитоза они размножаются в лейкоцитах.*  Коксиеллы поражают клетки эндотелия кровеносных сосудов и обуславливают развитие периваскулитов, но не панваскулитов в отличие от прочих риккетсий.

**Клинические проявления лихорадки Ку**. Инкубационный период составляет 1-3 недели. Лихорадка Ку характеризуется полиморфизмом клинических проявлений. Заболевание носит характер лихорадки с поражением дыхательной системы (пневмонии), гепатолиенальным синдромом (гепатиты) или энцефалопатии. Сыпь встречается редко, у 5-25% больных в виде розеопапул. Лихорадка, которая является постоянным клиническим признаком, начинается на 2-й или 3-й день болезни и длится около 3 недель.

**Микробиологическая диагностика**.

* Антитела выявляют в серологических реакциях (РСК, РНИФ, ИФА) с применением антигенов I и II фаз коксиелл.
* Серологические реакции ставятся с антигенами I и II фазы. Положительная реакция с антигеном II фазы указывает на наличие болезни в настоящем, положительная реакция с антигенами I и II фазы указывает на перенесенное ранее заболевание.
* Обнаружение у больного lgG к антигенам I фазы в титре 1:800 наблюдается при хроническом течении болезни.

**Лечение** препаратами тетрациклинового и хинолонового ряда. Лечение хронических форм и осложнений требует длительного применения (несколько месяцев) антибиотиков – тетрациклина.

* **Неспецифическая профилактика** сводится к постоянному эпидемиологическому и санитарно-ветеринарному надзору за коксиеллезом в эндемичных районах с последующей выбраковкой больных сельскохозяйственных животных. Рекомендуется пастеризация молока при температуре71,50C в течение 15 секунд .
* **Специфическая профилактика.** Проводят вакцинацию сотрудников лабораторий, работающих с C.burnetii.

**Ориенции (род Orientia)**

**Ориенции (род Orientia)** - грамотрицательные палочковидные бактерии. Облигатные внутриклеточные паразиты. Входят в семейство **Rickettsiaceae**, род **Orientia**. Представлены видом **Orientia tsutsugamushi** (ранее R. tsutsugamushi), который имеет 6 сероваров. Отсутствует пептидогликан клеточной стенки. **Orientia tsutsugamushi** вызывает **кустарниковый тиф (лихорадку цуцугамуши)**, сопровождающийся первичным аффектом, лихорадкой, макулопапулезной сыпью, поражением нервной и сердечно-сосудистой систем и лимфаденопатией.

**Морфо-биологические свойства ориенций.** По морфо-биологическим свойствам сходны с риккетсиями. Однако у них отсутствуют некоторые компоненты пептидогликана и ЛПС клеточной стенки (мурамовая кислота, глюказамин и окисленные жирные кислоты). Культивируются в 4-5-дневных куриных эмбрионах и культуре клеток, размножаются только в цитоплазме пораженных клеток. По антигенной структуре имеет 6 сероваров, а также общие антигены с протеем ОХк. Патогенность связана с пилями, ЛПС и протеинами внешней оболочки.

**Патогенез эрлихиозов.** Патогенез эрлихиозов связан с лимфо-гематогенным распространением возбудителей по организму и поражением моноцитов крови и макрофагов печени, селезенки, лимфатических узлов, костного мозга с развитием инфильтратов и очагов некроза. Формируется миелоидная гипоплазия, отмечается лейкопения, тромбоцитопения, при лихорадке Сеннетсу – моноцитоз. Это приводит к кровотечениям. Нарушается функция печени и почек. В процесс вовлекается также эндотелий капилляров, образуется сыпь.

**Эпидемиология эрлихиозов**

Источником моноцитарного и гранулоцитарного эрлихиозов являются мелкие грызуны, олени, косули, собаки и домашний скот, на которых паразитируют иксодовые клещи. Передача возбудителей происходит при укусе клеща через его слюну. На месте укуса первичный аффект, как правило, не возникает. Источником инфекции при эрлихиозе Сеннетсу являются моллюски рыб. Заражение происходит, очевидно, при употреблении в пищу сырой рыбы. Входные ворота рото-глотка.