

Занятие 15

Микробиологическая диагностика
зоонозных инфекций, вызванных
грамотрицательными палочками
(роды *Brucella*, *Francisiella*, *Yersinia*)

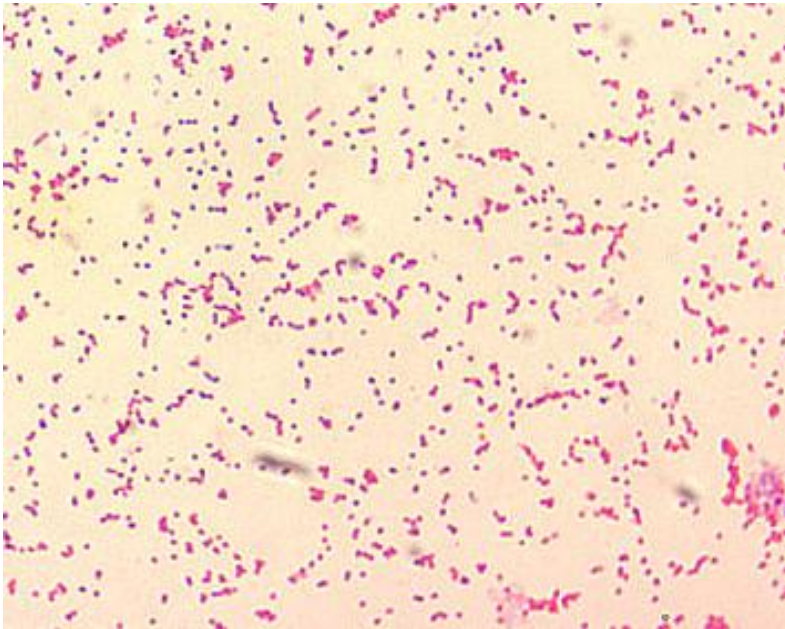
Род *Brucella*

- ▶ *Brucella melitensis*
- ▶ *Brucella abortus*
- ▶ *Brucella suis*
- ▶ *B. ovis*
- ▶ *B. canis*

Морфо-биологические особенности

Бруцеллы - мелкие, неподвижные, грамотрицательные палочки или кокобациллы размером 0.5-0.6x0.6-1.5 мкм. Полиморфны. Спор не образуют. Некоторые виды при росте на среде с иммунологической сывороткой формируют нежную капсулу. Под действием антибиотиков превращаются в L-формы.

Бруцеллы — аэробы, требовательны к питательным средам. Оптимальной средой для культивирования является печеночный агар . На плотных питательных средах образуют мелкие, выпуклые, гладкие, мутные негемолитические S-колонии. Хорошо культивируются в желточном мешке куриного эмбриона.



(мазок из чистой культуры и колонии бруцелл на печеночном агаре)

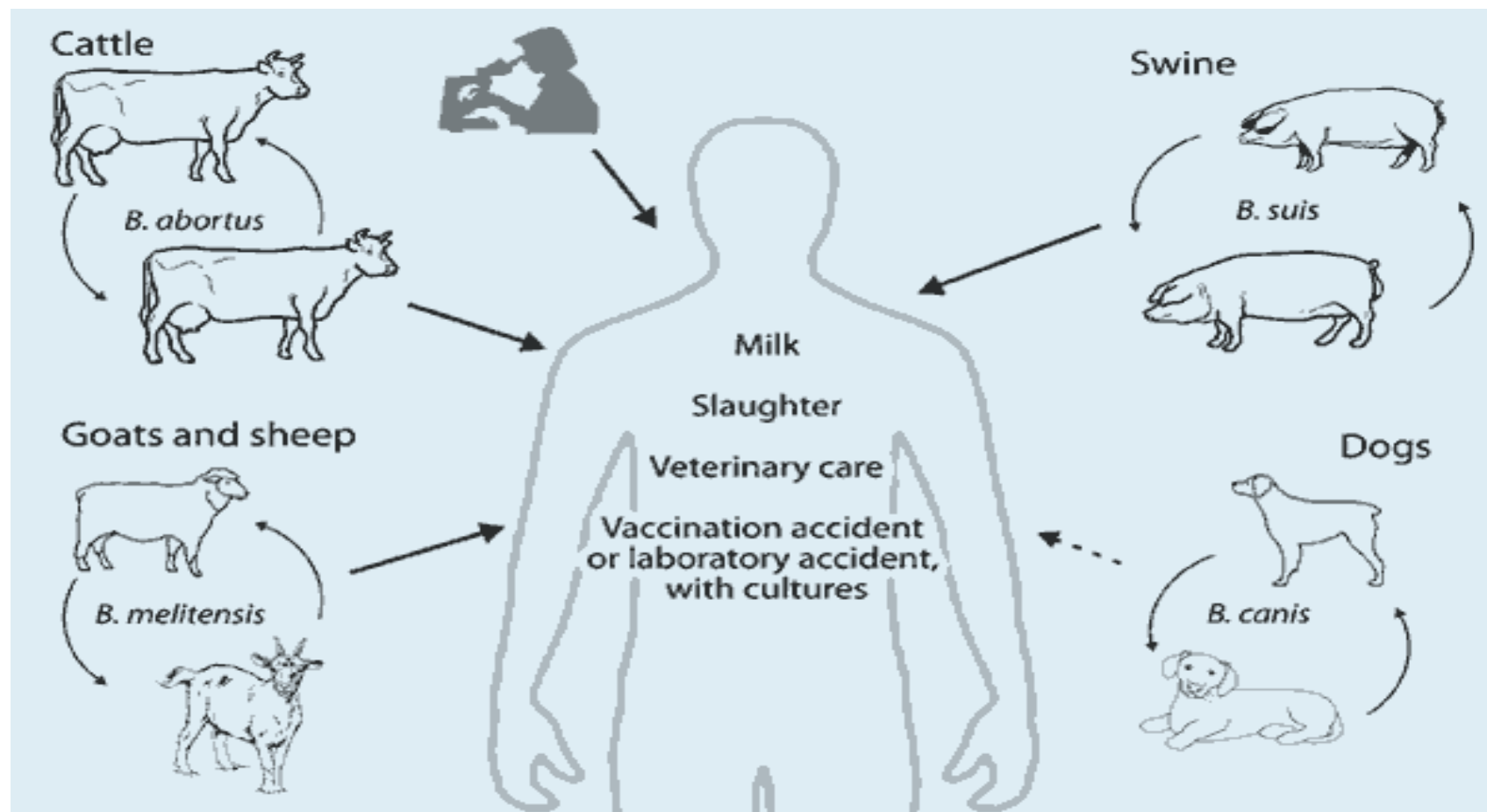
Внутривидовая дифференциация бруцелл

Вид	Бактериостатическое действие красителей		Образование H ₂ S
	фуксин	тионин	
Brusella melitensis	+	+	-
Brusella abortus	+	-	+
Brusella suis	-	+	+

Антигенная структура

- ▶ Имеют соматический О- и капсульный К- антигены. Различные виды бруцелл схожи по антигенной структуре , что затрудняет дифференциацию видов реакцией агглютинации.
- ▶ Различные виды бруцелл различаются количественным соотношением двух основных поверхностных антигенов: А (*abortus*) и М (*melitensis*) . Такое соотношение у *B.abortus* составляет 20:1, у *B.melitensis* - 1:20, у *B.suis* - 1:2.
- ▶ Бруцеллы имеют общий антиген с *V.cholerae*

Источник инфекции и пути заражения



Факторы патогенности:

Бруцеллы являются факультативными
внутриклеточными паразитами.

- ▶ высокая инвазивная способность
- ▶ капсула и эндотоксин
- ▶ низкомолекулярные вещества, ингибирующие
слияние фагосом с лизосомами

Источник инфекции и пути передачи

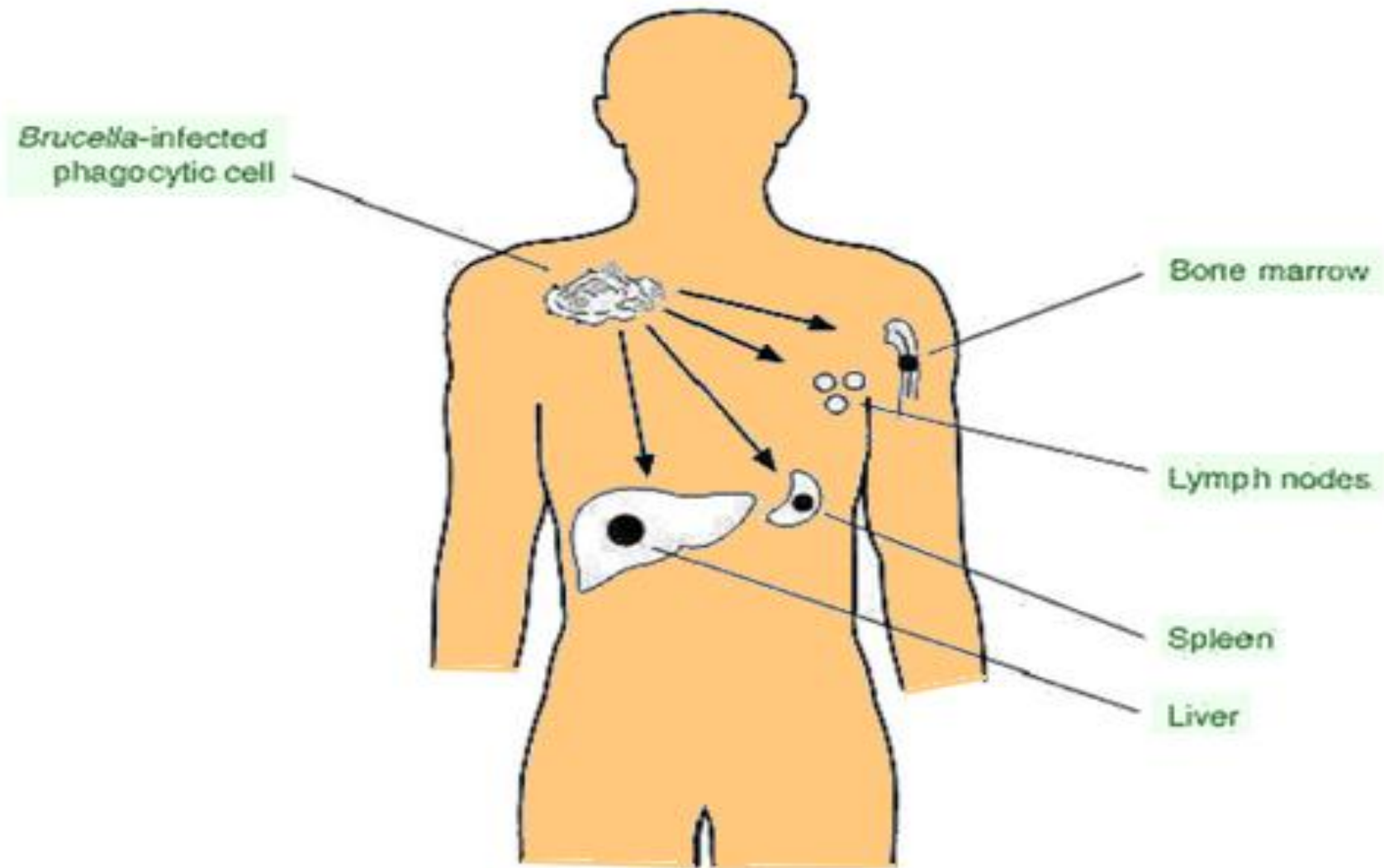
- ▶ Бруцеллез - зоонозная инфекция , резервуаром возбудителя в природе являются животные. Основным источником инфекции для человека – сельскохозяйственные и домашние животные.
- ▶ *Алиментарный путь*
- ▶ *Контактный путь*
- ▶ *Аэрогенный путь*

Больной человек не заразен. Однако работники лабораторий заражаются при работе с патологическим материалом , взятых у больных бруцеллезом.

Патогенез бруцеллеза

- ▶ Бруцеллы проникают в организм через кожу или слизистые оболочки, распространяются по лимфатическим путям и депонируются в лимфоузлах. В период инкубации бактерии размножаются в макрофагах регионарных лимфатических узлов.
- ▶ Из лимфоузлов бруцеллы попадают в кровоток и диссеминируют в печень, селезенку и костный мозг. В дальнейшем бактерии могут попадать в молочные железы человека и появиться в грудном молоке. В органах бруцеллы, вследствие способности к внутриклеточному паразитизму, длительно сохраняются и формируют очаги некроза, окруженные инфильтратами. Заболевание характеризуется хроническим течением со сменой обострений и ремиссий. При обострениях процесса бруцеллы вновь усиленно размножаются, попадают в кровоток, вызывая повторные волны генерализации.

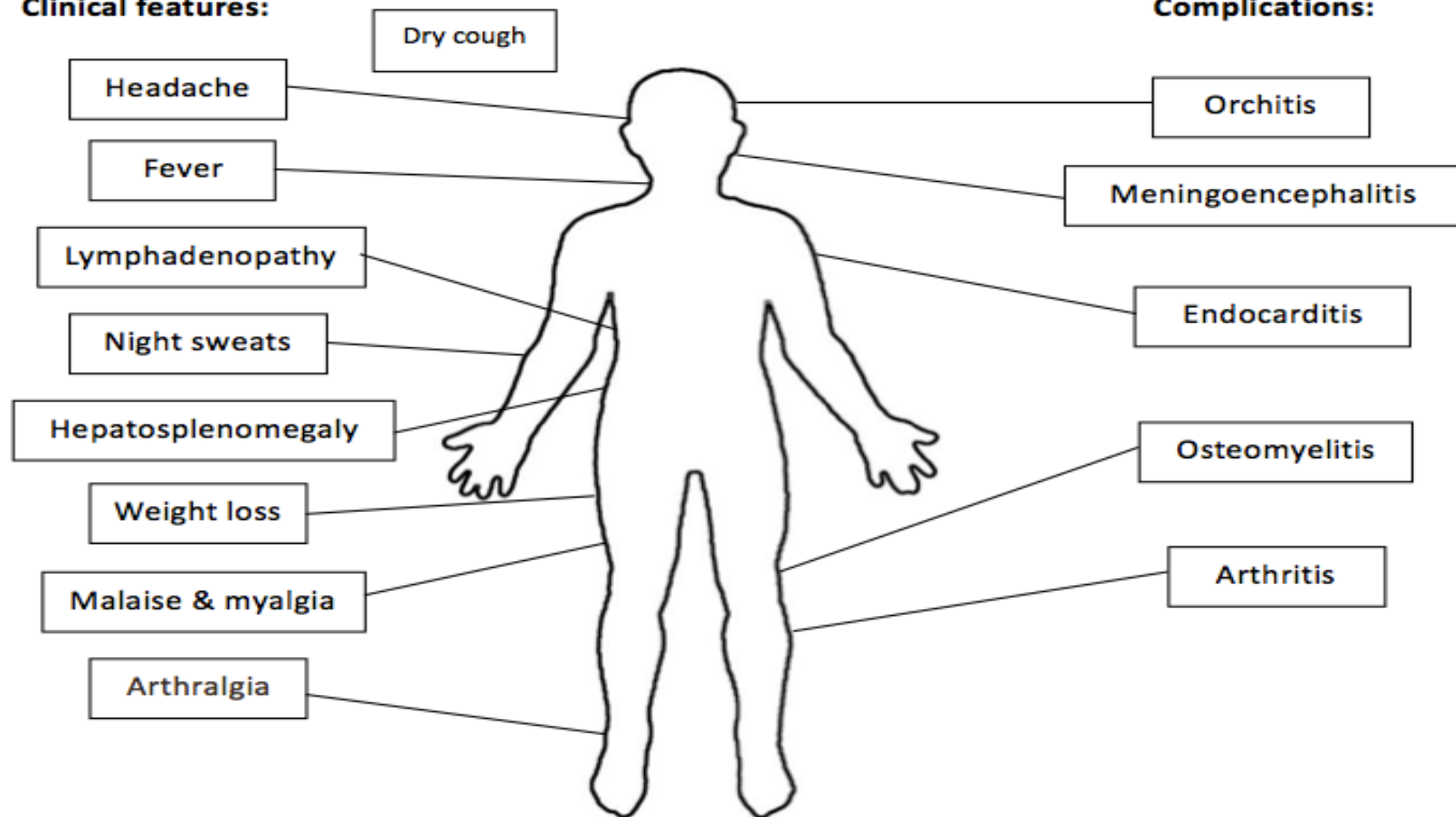
Патогенез бруцеллеза



Клинические проявления бруцеллеза

Clinical features:

Complications:



Микробиологическая диагностика

(материалы исследования)

- ▶ кровь
- ▶ пунктат костного мозга
- ▶ моча
- ▶ испражнения
- ▶ молоко и молочные продукты
- ▶ кусочки органов

Микробиологическая диагностика

- ▶ **Бактериологический метод** — инокуляция исследуемого материала в определенные питательные среды , чистую культуру возбудителя получают через 3-4 недели инкубации.
- ▶ Возбудителей выделяют из крови (**гемокультура**), пунктата костного мозга (**миелокультура**), мочи (**уринокультура**).
- ▶ Для дифференцировки полученной культуры используют способность к образованию сероводорода , чувствительность к бактериостатическому действию анилиновых красителей .

Микробиологическая диагностика:

- ▶ *Серологический метод* - основной диагностический метод при бруцеллезе .
- ▶ Уже на 1-й неделе заболевания в сыворотке крови больного появляется IgM , достигая максимального титра к 3-й неделе и обнаруживается при хронической форме бруцеллеза.
- ▶ На 3-й неделе заболевания появляются IgG и IgA, достигая максимального титра к 6-8-й неделе, которые обнаруживаются при хроническом течении бруцеллеза .

Микробиологическая диагностика:

(серологический метод)

- ▶ Реакция Хедельсона (ориентировочная , микроагглютинация на стекле) позволяет определять антитела в сыворотке крови больного.
- ▶ С помощью реакции Райта (развернутая агглютинация) определяют титр антител. Высокий титр антител (выше 1:80) отмечается при остром бруцеллезе .
- ▶ Реакция Кумбса ставится для определения неполных блокирующих антител .
- ▶ Иммуноферментный анализ позволяет определять антитела IgA, IgG, IgM .

Микробиологическая диагностика:

- ▶ *Биологический метод основан на заражении (подкожно)* лабораторных животных – белых мышей и морских свинок.
- ▶ *Аллергическая проба (проба Бюрне)* применяют для выявления гиперчувствительности замедленного типа к бруцеллам. Больному в средней трети предплечья вводят внутрикожно 0,1 мл (протеиновый экстракт из культуры бруцелл). Положительной реакцией считают инфильтрат, покраснение размером 4-6 см, которые возникают через 24-48 часов.

Профилактика

- ▶ Людям, занимающимся животноводством, вакцинацию проводят по эпидемическим показаниям с использованием живой бруцеллезной вакцины.
- ▶ Вакцина является реактогенной и не обладает высоким защитным эффектом.

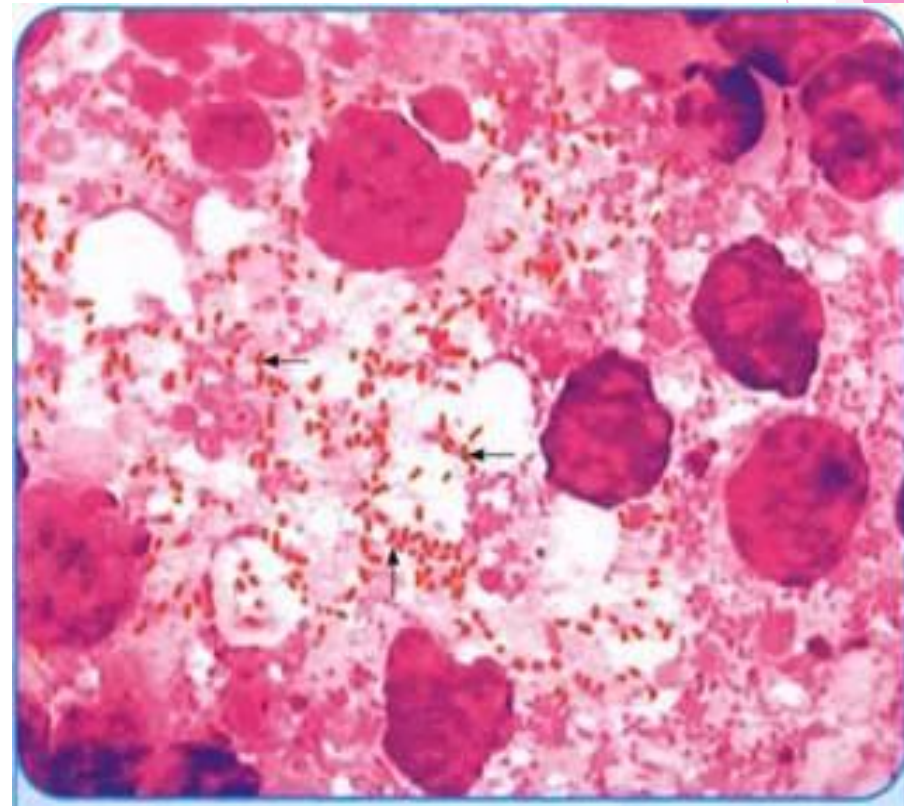
Лечение

- ▶ Бруцеллы чувствительны к тетрациклину и стрептомицину.
- ▶ При хронической форме бруцеллеза применяется специфическая иммунотерапия убитой лечебной бруцеллезной вакциной или бруцеллина .

Возбудитель туляремии

Морфо-биологические свойства

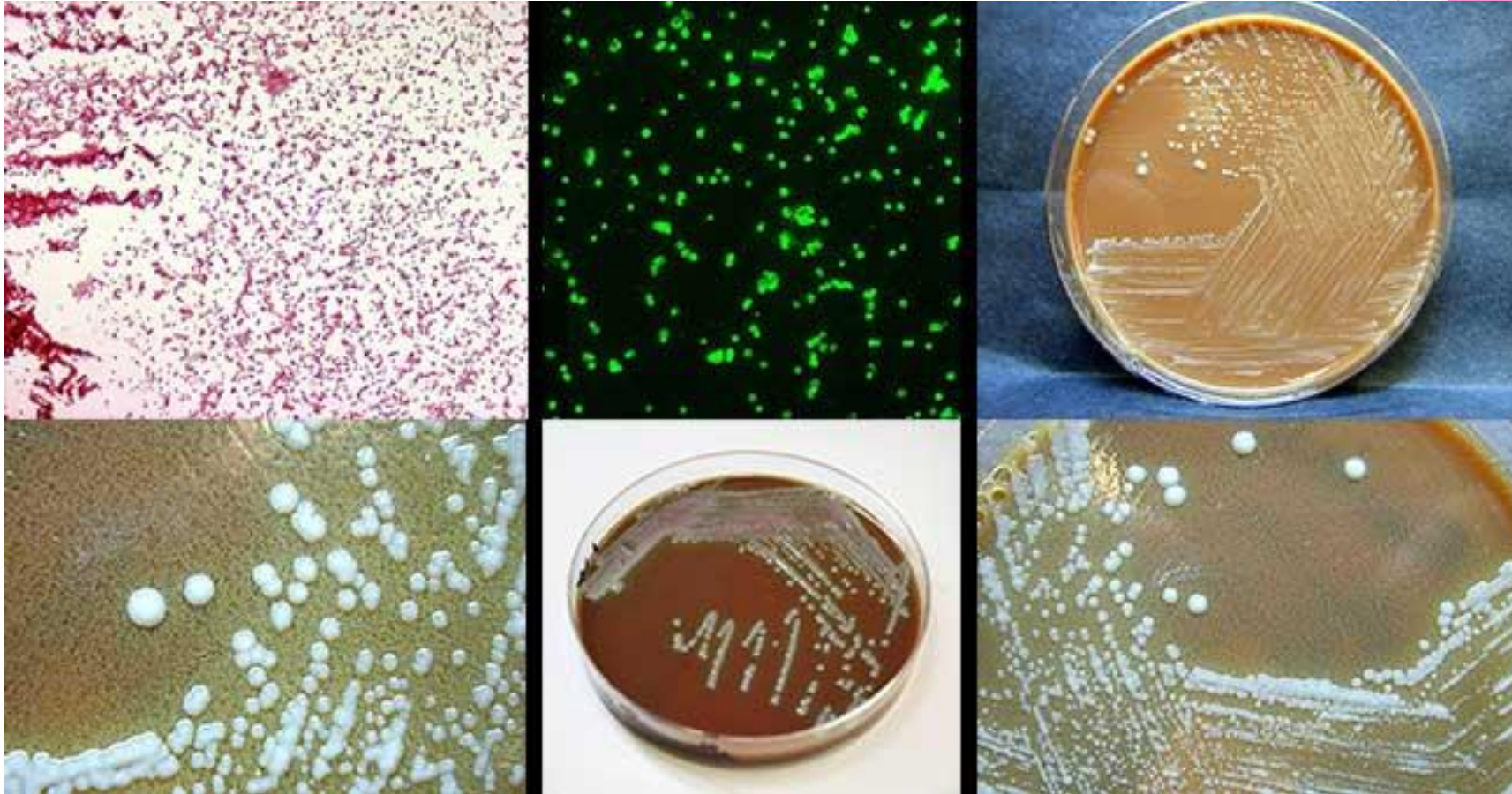
Francisella tularensis — мелкие грамотрицательные коккобациллы размером 0,3-0,6x0,1-0,2мкм. Им свойственен полиморфизм: могут иметь сферическую, нитевидную и др. формы, проходящие через бактериальные фильтры. Спор не образуют, неподвижны, могут образовывать нежную капсулу.



Francisella tularensis

- ▶ Факультативный анаэроб . На простых питательных средах не растет . Культивируются на желточных средах(среда Мак-Коя) или на средах с добавлением крови и цистеина(среда Френсиса) при температуре 37-38⁰С .
- ▶ *На плотных питательных средах в течение* 4-14 дней образует мелкие колонии молочно-белого цвета диаметром 1-3мм .
- ▶ Вирулентные штаммы образуют S-колонии . При культивировании на искусственных питательных средах вирулентные S-формы превращаются в авирулентные и неиммуногенные R-формы.
- ▶ Возбудитель туляремии хорошо культивируется в желточном мешке куриного эмбриона.

Francisella tularensis



Источник инфекции и пути заражения

- ▶ Туляремия – природно-очаговое заболевание . Источником инфекции в естественных условиях являются главным образом мелкие грызуны(полевые мыши , водяные крысы, ондатры и др.) и зайцы . На территории природных очагов туляремией могут заражаться овцы, свиньи, крупный рогатый скот.

Патогенез заболевания

- ▶ Возбудитель туляремии - *F.tularensis* попадает в организм человека через кожу, слизистые оболочки глаз, дыхательных путей, желудочно-кишечного тракта.
- ▶ После проникновения в организм возбудитель распространяется с током лимфы. Несмотря на активное поглощение бактерий фагоцитами, полного уничтожения не происходит, что создает предпосылки для депонирования бактерий в лимфатических узлах. Часть возбудителей погибает, что сопровождается выделением эндотоксина, действующего на лимфатические узлы с развитием первичных очагов и формированием туляремийных бубонов.

Патогенез заболевания

- ▶ При туляремии также, как и при чуме развиваются первичные (депонирование возбудителя в лимфоузлах) и вторичные бубоны (генерализованная форма). Периодически из сформированных первичных очагов возбудитель проникает в лимфо- и кровотоки, что приводит к распространению бактерий в печень, селезенку, легкие, костный мозг и другие органы, образуя вторичные очаги.

Клинические проявления бубонной формы туляремии:

(бубонная, язвенно-бубонная, глазо--бубонная и др.)



Микробиологическая диагностика

- ▶ **Бактериологический метод** – хотя выделить возбудитель из патологического материала (кровь, пунктат из бубона, отделяемое конъюнктивы, налет из зева, мокрота и др.) возможно, бактериологический метод в диагностике туляремии редко дает положительные результаты.
- ▶ **Серологический метод – РА.** В качестве диагностикума используют суспензию убитых формалином бактерий . Положительный результат реакции при разведении сыворотки 1:160 и больше выявляют у лиц, болеющих туляремией и перенесших инфекцию.
- ▶ **Аллергическая проба** – ставят накожную или внутрикожную пробу с использованием взвеси бактерий, убитых нагреванием (тулярин). За положительный результат принимают инфильтрат диаметром не менее 5 мм.

Лечение

- ▶ Стрептомицин
- ▶ Гентамицин
- ▶ Тетрациклин

F.tularensis не чувствительны бета-лактамным препаратам!

Профилактика

- ▶ **Неспецифическая профилактика** (борьба с грызунами)
- ▶ **Специфическая профилактика.** Вакцинацию проводят лицам, относящимся к группе риска с использованием живой ослабленной туляремийной вакцины.

Род *Yersinia*

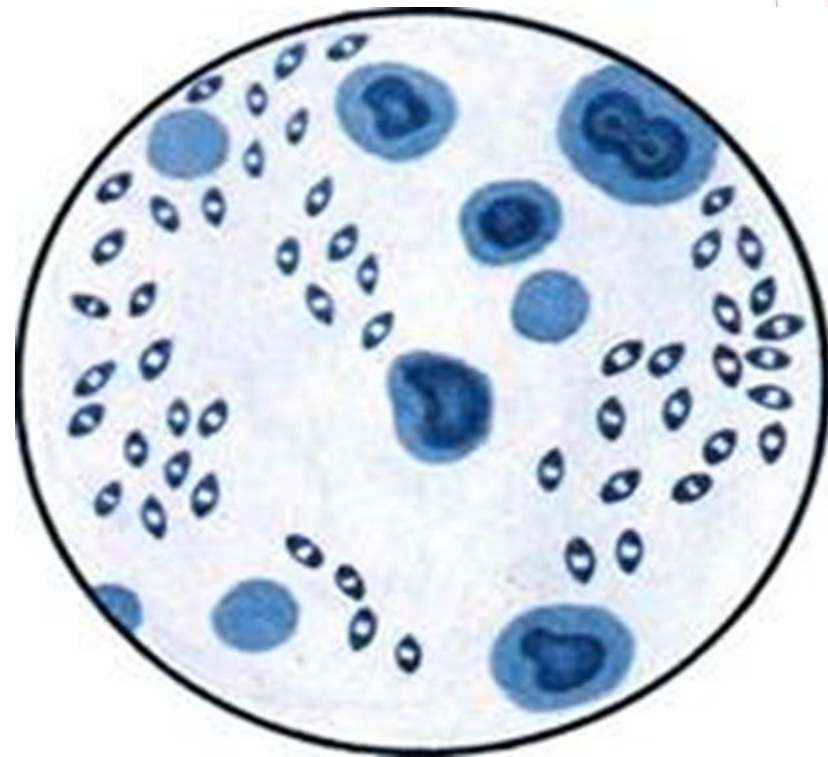
Семейство: Enterobacteriaceae

Род: *Yersinia*

Вид: *Y.pestis*, *Y.enterocolitica*, *Y.pseudotuberculosis*

Морфо-биологические свойства:

Y.pestis —грамотрицательные
неподвижные палочки овоидной
формы, размером $0.4-0.7 \times 1-2$ мкм
Образуют нежную капсулу.



Yersinia pestis

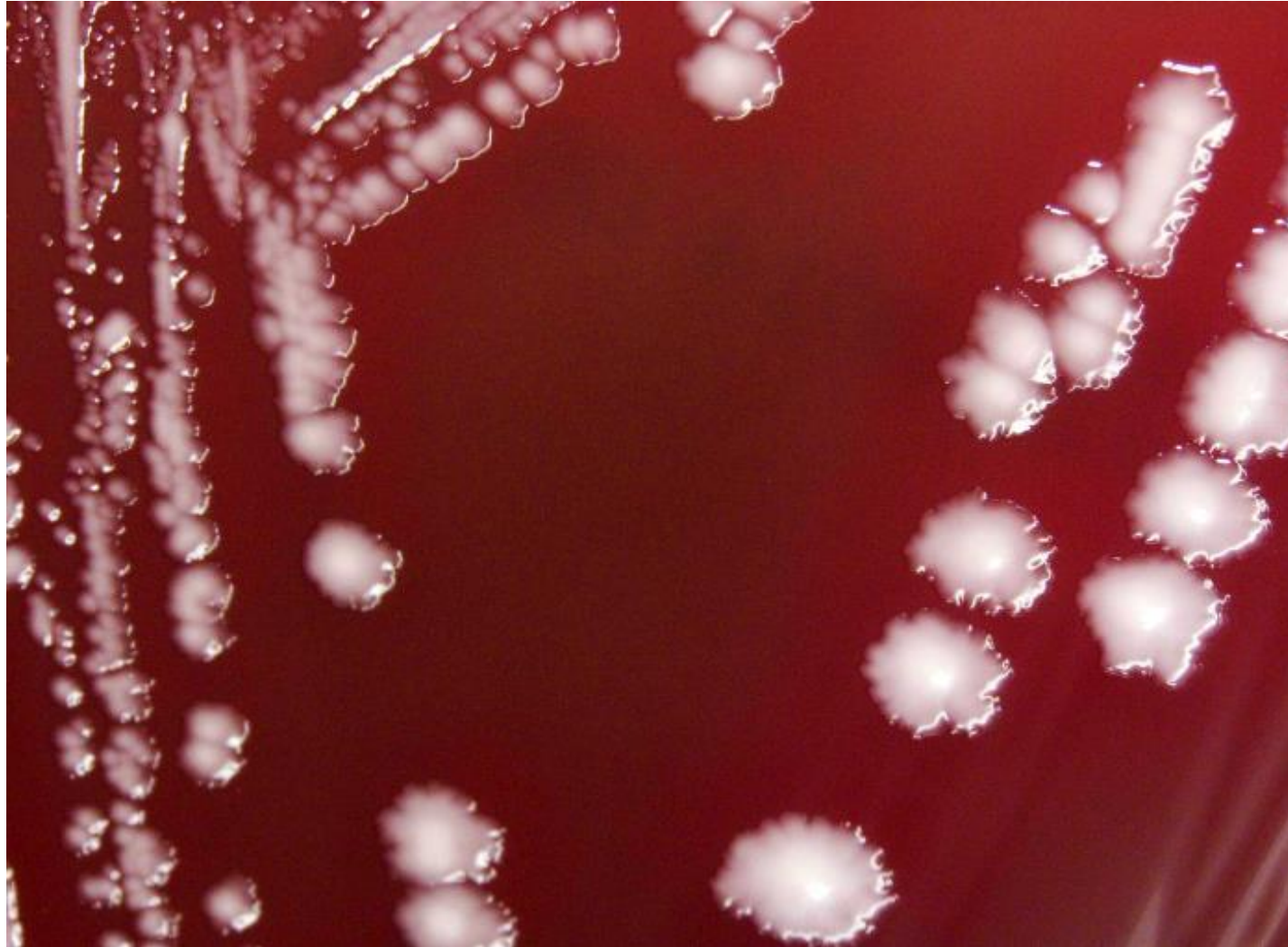
Культуральные свойства- факультативный анаэроб, селективной средой которого является казеиновая среда и гидролизат сгустка крови.

На плотных питательных средах образуют колонии с неровными краями. Через 48 часов инкубации вирулентные бактерии образуют колонии в R-форме, напоминающие кружевные платочки. Менее вирулентные бактерии образуют колонии в S-форме.

На жидких средах растут в виде пленки, от которой спускаются нити, напоминающие пещерные сталактиты.

Yersinia pestis

(колонии на кровяном агаре)



Дифференциация на виды внутри рода *Yersinia*

Показатель	<i>Y. pestis</i>	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>Y. pseudotuberculosis</i>
Подвижность	-	+	+
Продукция индола	-	±	-
Гидролиз желатины	-	-	-
Реакция Фогеса – Проскауэра	-	±	-
Рамноза	-	-	+
Сахароза	-	+	-
Декстрин	+	-	-
Эскулин	+	±	-
Уреаза	-	+	+
Лизиндекарбоксилаза	-	-	-
Орнитидиндекарбоксилаза	-	+	-

Антигенная структура и факторы патогенности:

- ▶ Чумная палочка обладает комплексом антигенов, многие из которых относятся к факторам патогенности.
- ▶ *О-антиген (эндотоксин)* - токсичный для человека и животных .
- ▶ *Фракция I (F1-antigen)* –капсульный антиген, защищает бактерии от фагоцитоза, не оказывает токсического действия, не проявляет иммуногенные свойства.
- ▶ *Фракция II (F2-antigen)*, антагонист адренергических рецепторов, представлен белковоподобным веществом, локализованным внутриклеточно. Вызывает шок и смерть лабораторных животных: LD50 для мышей менее 1 мг (также токсичен для крыс). Мышиный токсин” обладает способностью ингибировать дыхательную активность митохондрий, понижая активность НАДФ-редуктазы.

Антигенная структура и факторы патогенности:

- ▶ **V/W (Vi)-антиген** состоит из белка (V-фракции) и липопротейна (W-фракции). Он проявляет антифагоцитарные свойства и способствует внутриклеточному размножению бактерий. Штаммы, содержащие только V/W-Ag, вирулентны для мышей.
- ▶ **Активатор плазминогена** — протеаза, активирующая лизис фибриновых сгустков, препятствующих диссеминированию возбудителя, и инактивирующая C3b и C5a компоненты комплемента.
- ▶ Кроме этого, *Y.pestis* синтезирует ферменты агрессии, такие как плазмокоагулаза, гемолизин, лецитиназа, гиалуронидаза и РНК-аза.

Источник инфекции и пути передачи:

- ▶ Источник инфекции – больные животные, в частности грызуны.
- ▶ Эпидемии чумы среди людей обычно следуют за эпизоотиями среди животных.
- ▶ Восприимчивость людей к чуме очень высокая. Индекс контагиозности приближается к единице.

Пути передачи:

- ▶ *Трансмиссивный путь(через укусы инфицированных блох)*
- ▶ *Контактный путь(при разделке шкур и мяса зараженных животных)*
- ▶ *Алиментарный путь(продукты, обсемененные чумными микробами)*
- ▶ *Воздушно-капельный путь(от больных легочной формой чумы)*

Патогенез и клинические проявления чумы:

- ▶ *Кожная форма чумы*
- ▶ *Бубонная форма чумы*
- ▶ *Кожно-бубонная форма*
- ▶ *Вторичные бубоны*
- ▶ *Первично-септическая форма*
- ▶ *Вторично-септическая форма*
- ▶ *Первично-легочная форма*
- ▶ *Вторично-легочная форма*
- ▶ *Кишечная форма*

Бубонная форма чумы



Септическая форма чумы



Микробиологическая диагностика:

- ▶ Все мероприятия проводят в специализированных лабораториях. В зависимости от клинической формы материалами для исследования являются пунктаты бубонов, мокрота, кровь, моча, рвотные массы, испражнения, трупный материал и др.
- ▶ Методы исследования: микроскопический, бактериологический, биологический и серологический.
- ▶ Микроскопический метод: микроскопия мазков окрашенных по Граму, Гимзе и метиленовым синим.
- ▶ В качестве экспресс-диагностики используют реакцию иммунофлюоресценции (РИФ).

Микробиологическая диагностика:

- ▶ **Бактериологический метод.** Патологический материал засевают на питательные среды; идентификацию выделенных культур проводят на основании морфологических , культуральных , биохимических свойств и чувствительности к бактериофагу.
- ▶ **Серологический метод (ИФА)**
- ▶ Биологическая проба проводится заражением морских свинок и крыс .
- ▶ **Молекулярно-генетический метод(ПЦР)**

Профилактика

- ▶ *Неспецифическая профилактика* направлена на предупреждение заражения людей и возникновения эпизоотий в природных очагах.
- ▶ В случае выявления чумы проводятся карантинные мероприятия. Для лиц, состоявших в контакте с больными, назначают профилактическое лечение тетрациклином.
- ▶ *Для специфической профилактики* используют вакцины из убитых формалином микроорганизмов. Активную иммунизацию проводят лицам, находящимся в эндемических очагах и работающими с возбудителем.

Лечение

Для лечения больных чумой используют стрептомицин. Альтернативным препаратом является тетрациклин, который можно использовать в комбинации стрептомицином.

Y.enterocolitica

Морфо-биологические свойства:

Y.enterocolitica – грамотрицательные палочки , размером 1.8-2.7х0.3-0.7мкм ,подвижные, спор и капсул не образуют . Факультативные анаэробы , хорошо растут на обычных питательных средах . На мясо-пептонном агаре образуют мелкие блестящие колонии в виде капелек росы. Глюкозу и сахарозу ферментируют до кислоты, не расщепляют рамнозу, продуцируют уреазу.

Антигенная структура - обладает О-, Н-антигенами

Факторы патогенности -продуцируют энтеротоксин

Патогенез и клинические проявления кишечного йерсиниоза

- ▶ Кишечный йерсиниоз –инфекционное заболевание с поражением кишечника и развитием мезентериального лимфаденита . Основной симптом – гастроэнтерит
- ▶ Поражение суставов – полиартриты .
- ▶ *Этиологический агент анкилозирующего спондилита*

Y.pseudotuberculosis

Морфо-биологические свойства:

Y.pseudotuberculosis – грамотрицательные подвижные бактерии размером 0.8-2x0.4-0.6 мкм не образуют спор, образуют капсулу. Факультативный анаэроб, хорошо растет на простых питательных средах. На плотных питательных средах при температуре 28°C образует колонии в S-форме, при температуре 37°C - колонии в R-форме. На жидких средах образует пленку. Биохимически неактивен: ферментируют рамнозу, продуцируют уреазу, не ферментируют сахарозу.

Антигенная структура - обладает О-, Н-антигенами.

Факторы патогенности - эндотоксин (ЛПС).

Патогенез и клинические проявления псевдотуберкулеза

- ▶ *Y.pseudotuberculosis* — инвазивав слизистую кишечника транскитозом через М-белки, попадает в мезентериальные лимфатические узлы, вызывая мезентериальный лимфаденит.
- ▶ Клинические симптомы — боли в эпигастральной области, симптомы раздражения брюшины, которые имитируют симптомы острого аппендицита.

Микробиологическая диагностика

- ▶ **Материалы исследования – испражнения, кровь**
- ▶ **Бактериологический метод.** Патологический материал засевают на питательные среды (МПА, Эндо, Мак Конки). После выделения чистой культуры проводят идентификацию на основании морфологических, культуральных, биохимических свойств.

Серологический метод – РПГА или ИФА