

Занятие 23.

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

Обсуждаемые вопросы

- 1. Морфобиологические особенности хламидий, классификация.
- • *Chlamydia trachomatis*, особенности, серотипы, источник заражения, пути заражения. Патогенетическая характеристика и микробиологическая диагностика трахомы, других хламидийных конъюнктивитов, негонококкового уретрита, венерической лимфогранулемы.
- • *Chlamydia psittaci*, особенности, источник заражения, пути заражения, патогенез и микробиологическая диагностика орнитоза.
- • *Chlamydia pneumoniae*, ее роль в патологии человека.
- 2. Морфобиологические особенности микоплазм, классификация
- • Род *Mycoplasma*, виды микоплазм, морфобиологические особенности, патогенетические особенности и микробиологическая диагностика вызываемых ими заболеваний.
- • Род *Ureaplasma*, виды уреоплазм, морфобиологические особенности, патогенетические особенности и микробиологическая диагностика вызываемых ими заболеваний.

Цель занятия

- ознакомить студентов с морфобиологическими особенностями патогенных хламидий (*Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia pneumoniae*) и микоплазм (родов *Mycoplasma* и *Ureaplasma*), патогенезом, микробиологической диагностикой, принципами лечения и профилактики вызываемых ими заболеваний.

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*

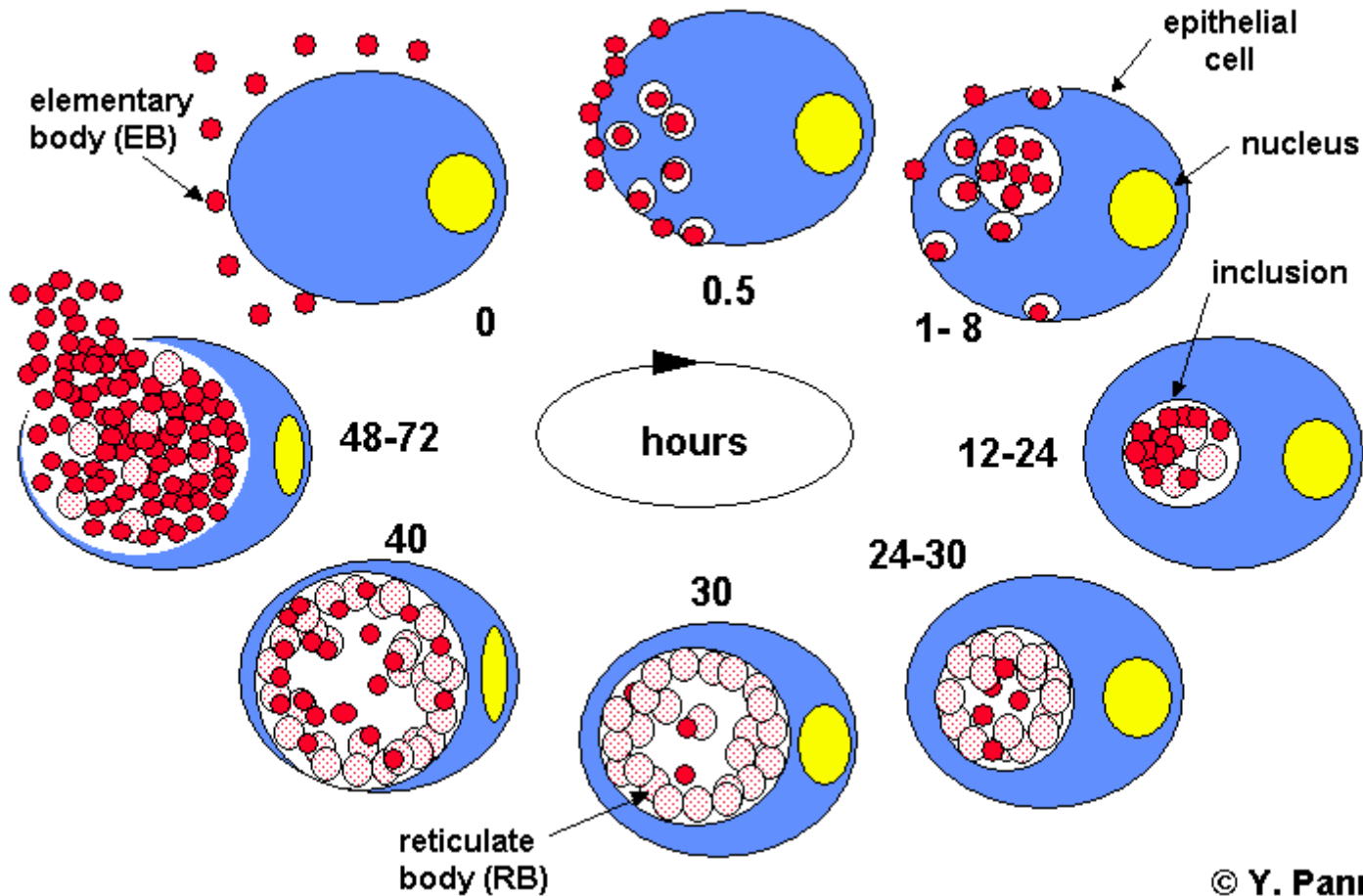
Морфо-биологические свойства

- *Свое название хламидии получили от греч. *chlamys* – 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 трансформацией элементарных телец в ретикулярные . Ретикулярные тельца являются вегетативной формой хламидий , могут быть овоидной , полулунной формы и крупнее элементарных телец (0,3x1,5 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.

Жизненный цикл хламидий в клетке хозяина



Характеристика хламидий

Признаки	<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	<i>Chlamydia psittaci</i>
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 сульфониламидам	+	-	-
<i>Chlamydia pneumoniae</i> ile DNT homologiyası	<10%	100%	<10%
Серовары	15 (A, B, B _a , 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 35⁰С
- Больше всех используют культуру клеток McCoу . *S. pneumoniae* лучше размножается в культуре клеток типа Нер-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

Chlamydia trachomatis

- В настоящее время известно **15** сероваров *C.trachomatis* - A, B, B_a, C, D-K, L (L1, L2, L3), которые вызывают разные нозологические формы.
- Серовары A, B, B_a 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 А, В, В_а, и С.*
- Возбудитель проникает в эпителий конъюнктивы и роговицы, где размножается, разрушая клетки. Развивается фолликулярный кератоконъюнктивит.
- В запущенных случаях вся конъюнктивка больного глаза усеяна зернышками тесно прилегающими друг другу , что напоминает «лягушачью икру». Название этой болезни в переводе с греч. «*trachys*» означает «шероховатый, неровный».

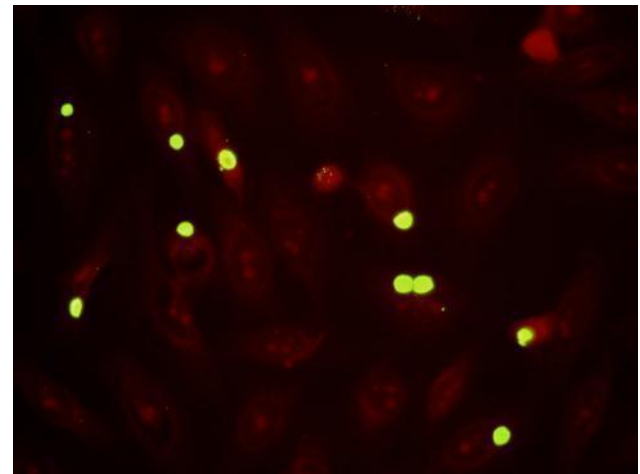
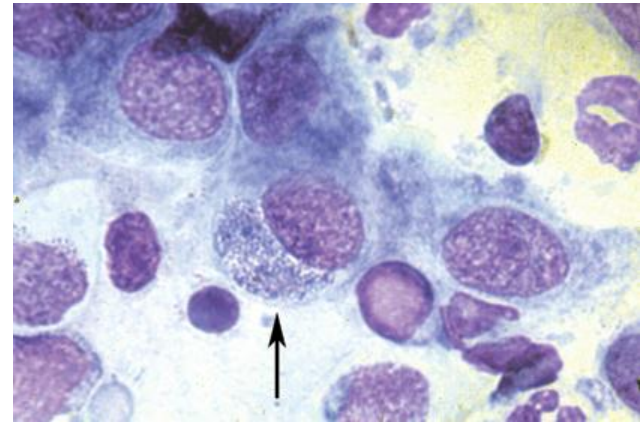
Трахома

(*фолликулярная гипертрофия*)



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 Хальбершtedтера-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»

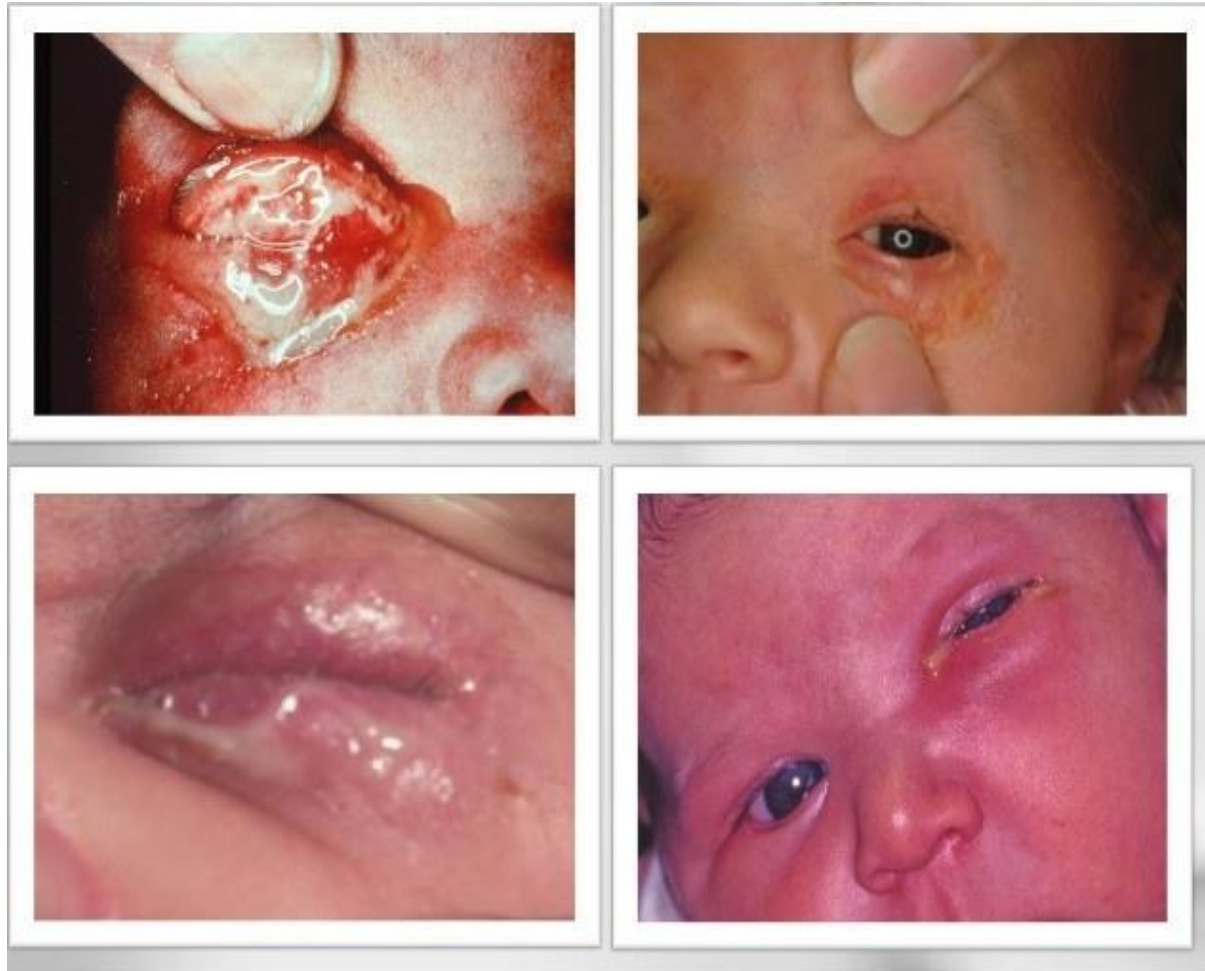
- Возбудители урогенитального хламидиоза могут попасть на слизистую оболочку глаз здоровых лиц при купании в нехлорированных бассейнах, в результате чего развивается кератоконъюнктивит («конъюнктивит бассейнов»)
- Хламидийный конъюнктивит также может развиваться в результате аутоинфекции (инокуляция 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.

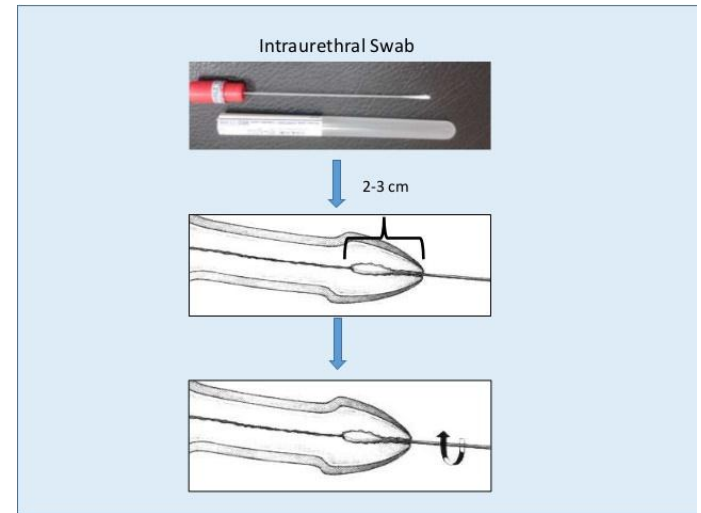
Инфекции

C. trachomatis у новорожденных



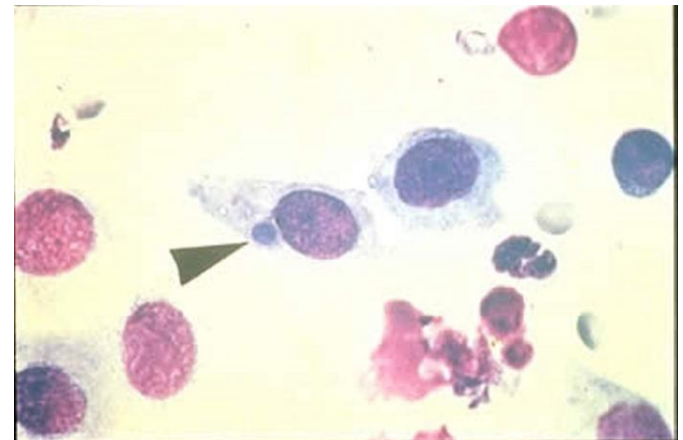
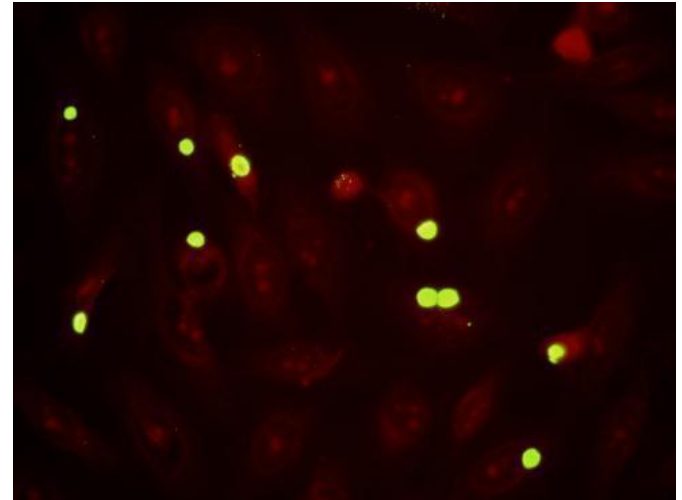
Диагностика урогенитального хламидиоза (материалы исследования)

- 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.



Диагностика урогенитального хламидиоза

- 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.*



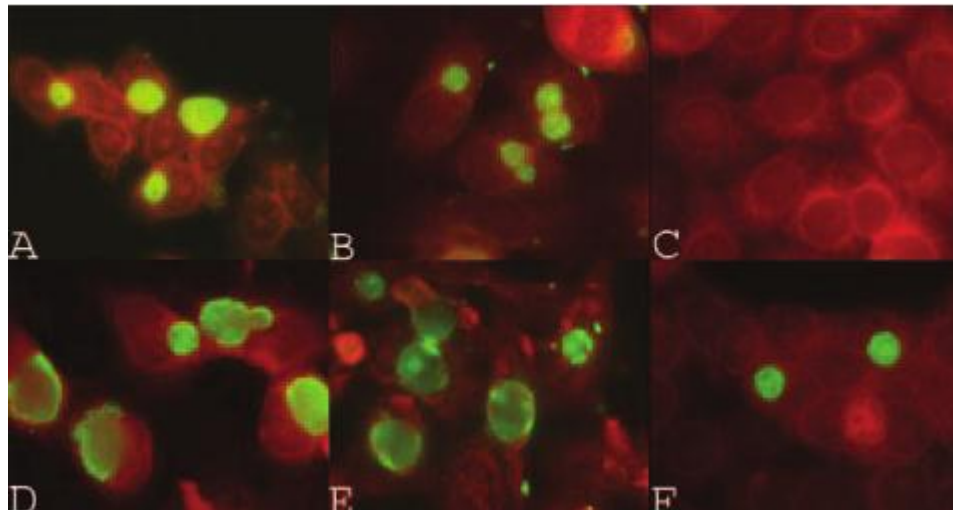
Диагностика урогенитального хламидиоза

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 McCoу.

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 IgM 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 (*Lymphogranuloma 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 (*Lymphogranuloma venereum*)



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 McCoу*.
- 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*).

Clamtydia 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 *Mycoplasma pneumoniae*.
- 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 в культуре клеток McCoу при 35-37 ° С в течение 3 дней. Далее при помощи РИФ с использованием моноклональных антител, меченых флюорохромом 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

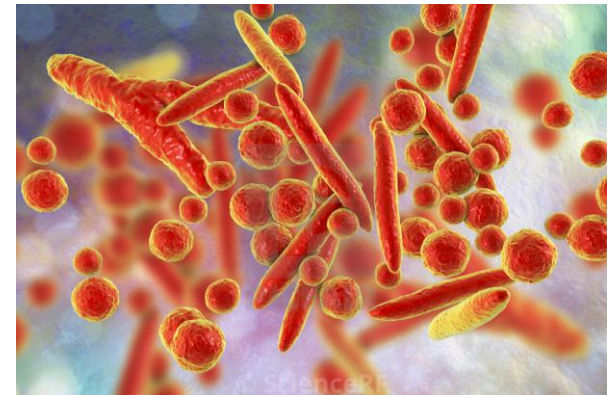
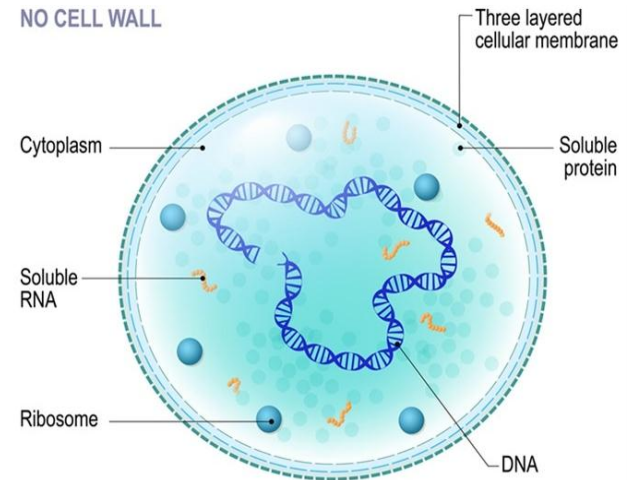
- Микоплазмы (*mykes*-гриб, *plasma*-нечто имеющее форму) прокариоты, не имеющие клеточной стенки.
- Микоплазмы относятся к классу *Mollicutes* (*mollis*-мягкий, *cutis*-кожа; мягкокожие) порядка *Mycoplasmatales* .
- Патогенными для человека являются виды родов *Mycoplasma* и *Ureaplasma*.

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

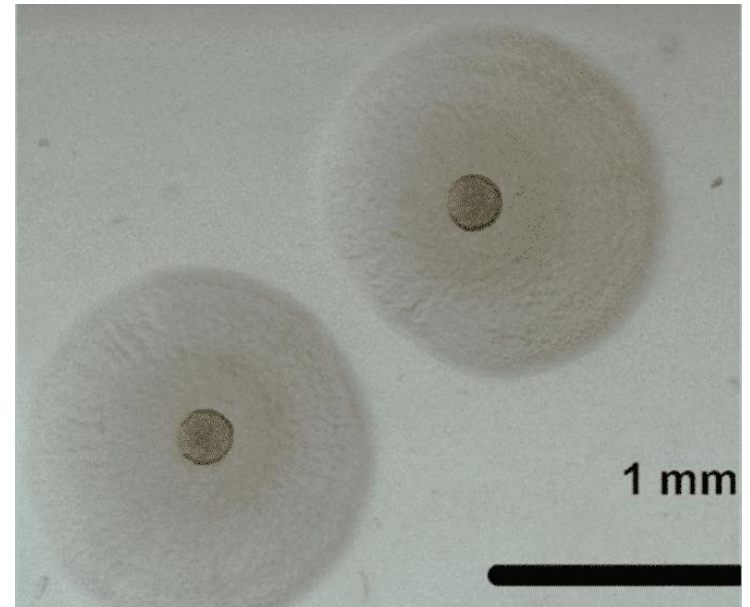
Род Мycoplasma

- 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.



Род Mycoplasma

- 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 36-37°C 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 обуславливают 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. pneumoniae*)
- **Ферменты агрессии** - фосфолипаза А, нейраминидаза, протеазы

Болезни, вызываемые микоплазмами

- **Респираторный микоплазмоз** – возбудитель *Mycoplasma pneumoniae*.
 - **Фарингит** вызванный *M. 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**).

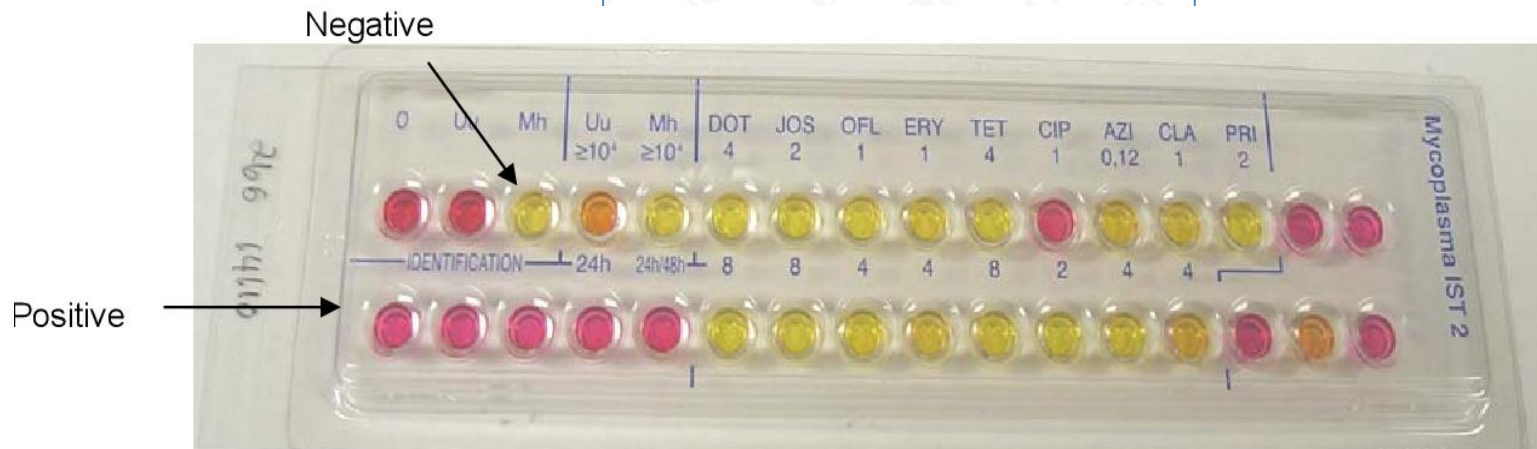
Микробиологическая диагностика (материалы для исследования)

- **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

Микробиологическая диагностика

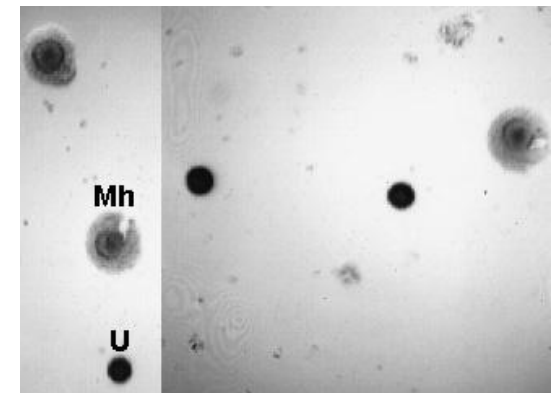
- Для выявления антигенов к микоплазмам в мазках, приготовленных из материалов используется прямой и непрямой **РИФ**.
- В последнее время стало возможным идентифицирование микоплазм в исследуемых материалах с использованием **ПЦР**.
- Можно получить и идентифицировать культуру патогена путем культивирования 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.

Mycoplasma cultivation diagnostic test



Род *Ureaplasma*

- Род *Ureaplasma* включает виды *U.urealyticum* и *U.parvum*. 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 **негонококковых уретритов** у мужчин вызваны *U. urealyticum*. 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 абортam и послеродовому сепсису.
- При проникновении уреаплазм в мочевые пути развивается **острый уретральный синдром**. Хроническое воспаление мочевыводящих путей и **фермент уреазы способствуют** развитию **мочекаменной болезни**.

Микробиологическая диагностика (материалы для исследования)

- 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.

Микроскопическая диагностика

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

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

