

ЗППП 2

**Кафедра микробиологии
и вирусологии**

Сифилис

Сифилис – антропонозное венерическое заболевание с длительным рецидивирующим течением, в ходе которого происходит смена нескольких периодов с разными клиническими проявлениями.

При сифилисе могут поражаться практически все системы и органы.

Таксономическое положение возбудителя сифилиса

Семейство Spirochaetaceae

Род *Treponema*

Вид *Treponema pallidum*

T.endemicum – возбудитель беджель
возбудитель пинты

T.carateum –

T.pertenue – возбудитель фрамбезии

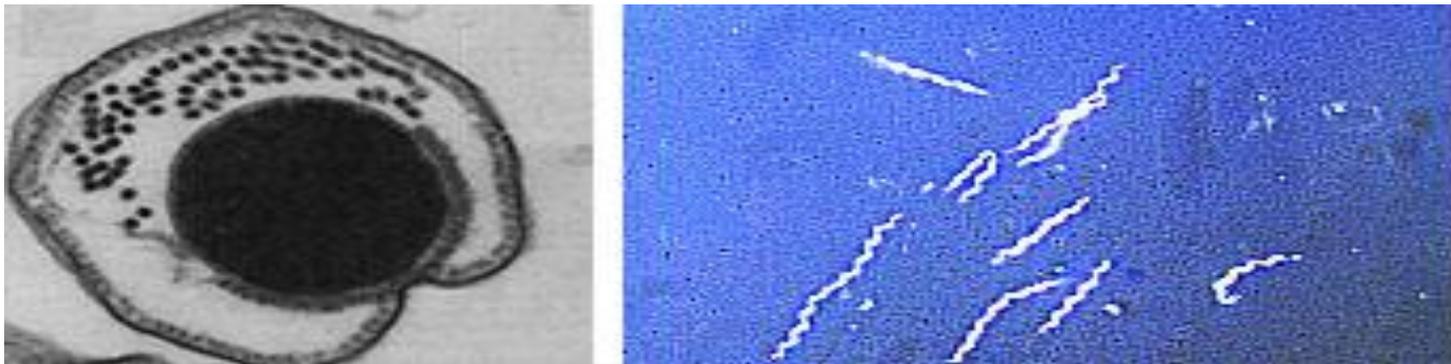
Фриц Рихард Шаудин (1871-1906)



В 1905 г. немецкие учёные Ф. Шаудин и Э. Гоффман впервые обнаружили бледную трепонему -

Treponema pallidum

Морфология T.pallidum



Трепонемы (*лат.* сгибающаяся, вращающаяся нить) – тонкие спиралевидные **прокариоты**,

Размеры клетки:

длина от 6-14 мкм, толщина 0,25-0,3 мкм,

амплитуда спирали 0,5x1,0 мкм.,

среднее количество равномерных завитков 8-12.

Снаружи трепонема иногда покрыта слизистым чехлом из кислых полисахаридов - псевдокапсулой,

спор не образует.

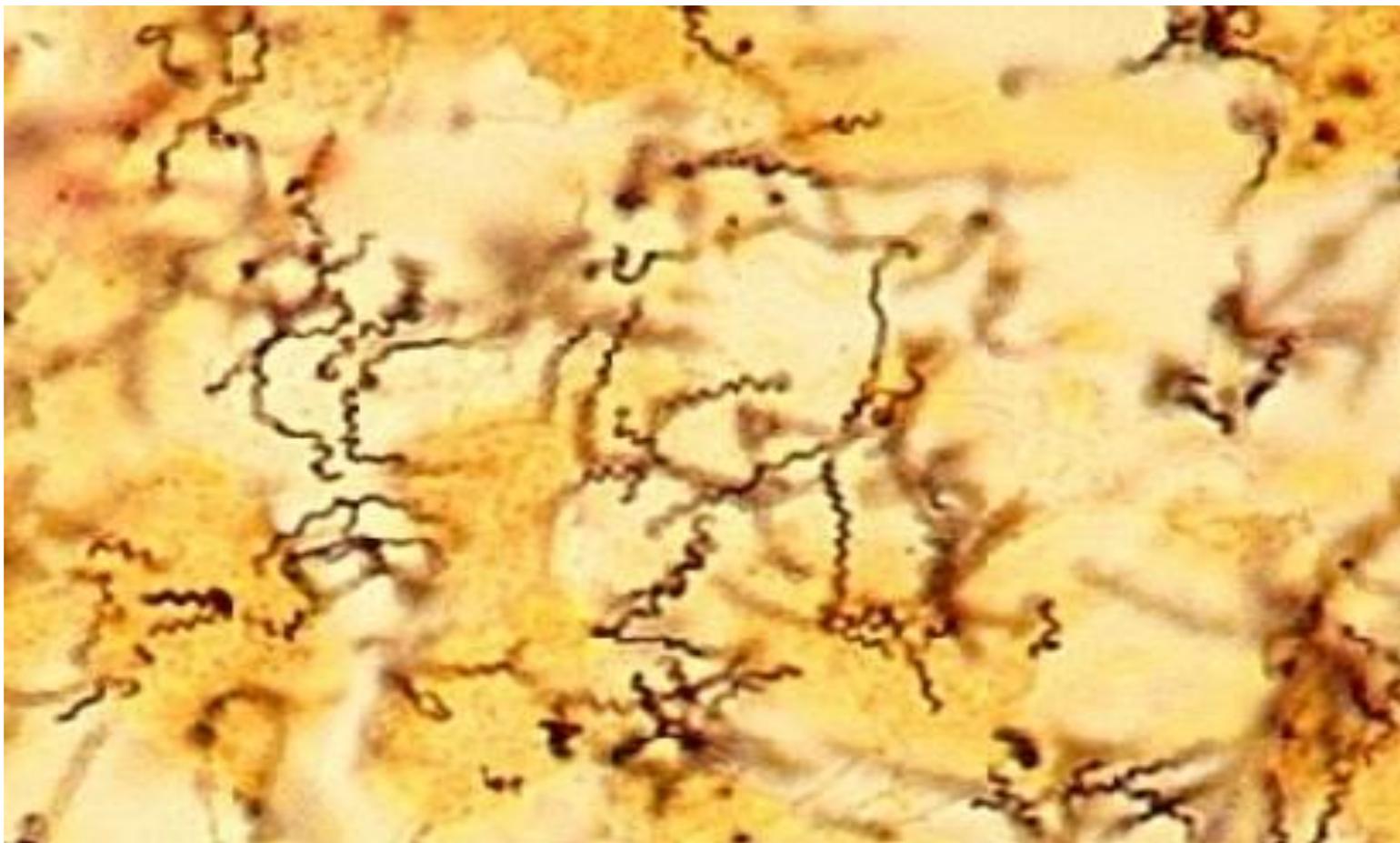
Тинкториальные свойства

T. pallidum **плохо окрашивается.**

Для окрашивания трепонем применяют метод импрегнации серебром по Морозову или метод Романовского-Гимзы.

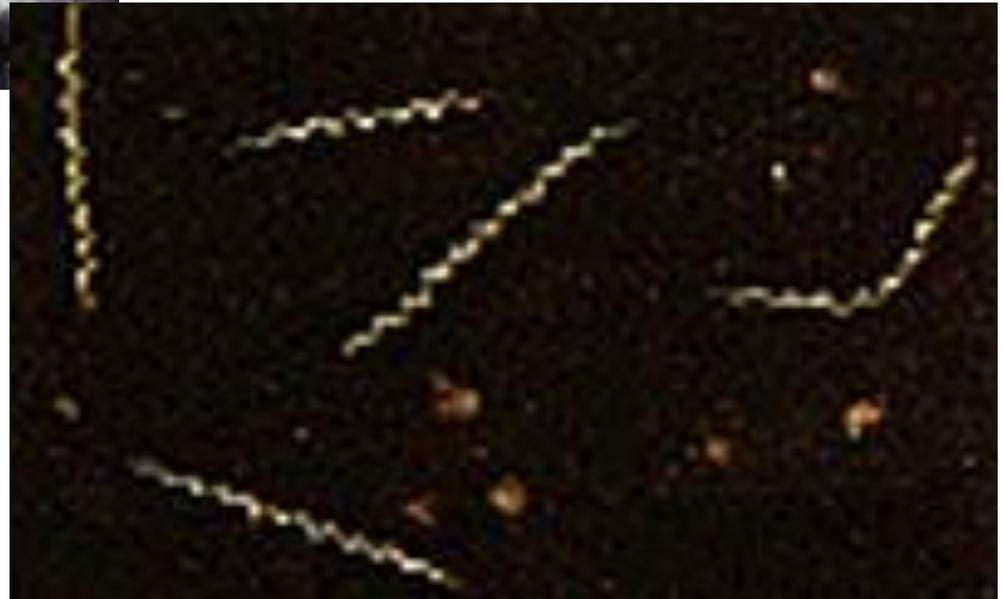
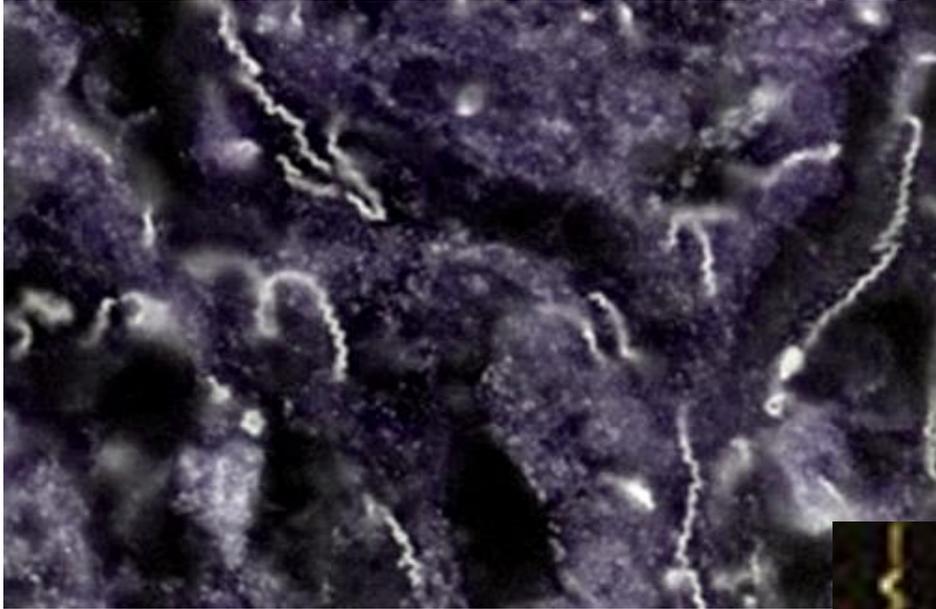
Можно изучать нативные препараты в темном поле зрения.

Метод импрегнации серебром по Морозову

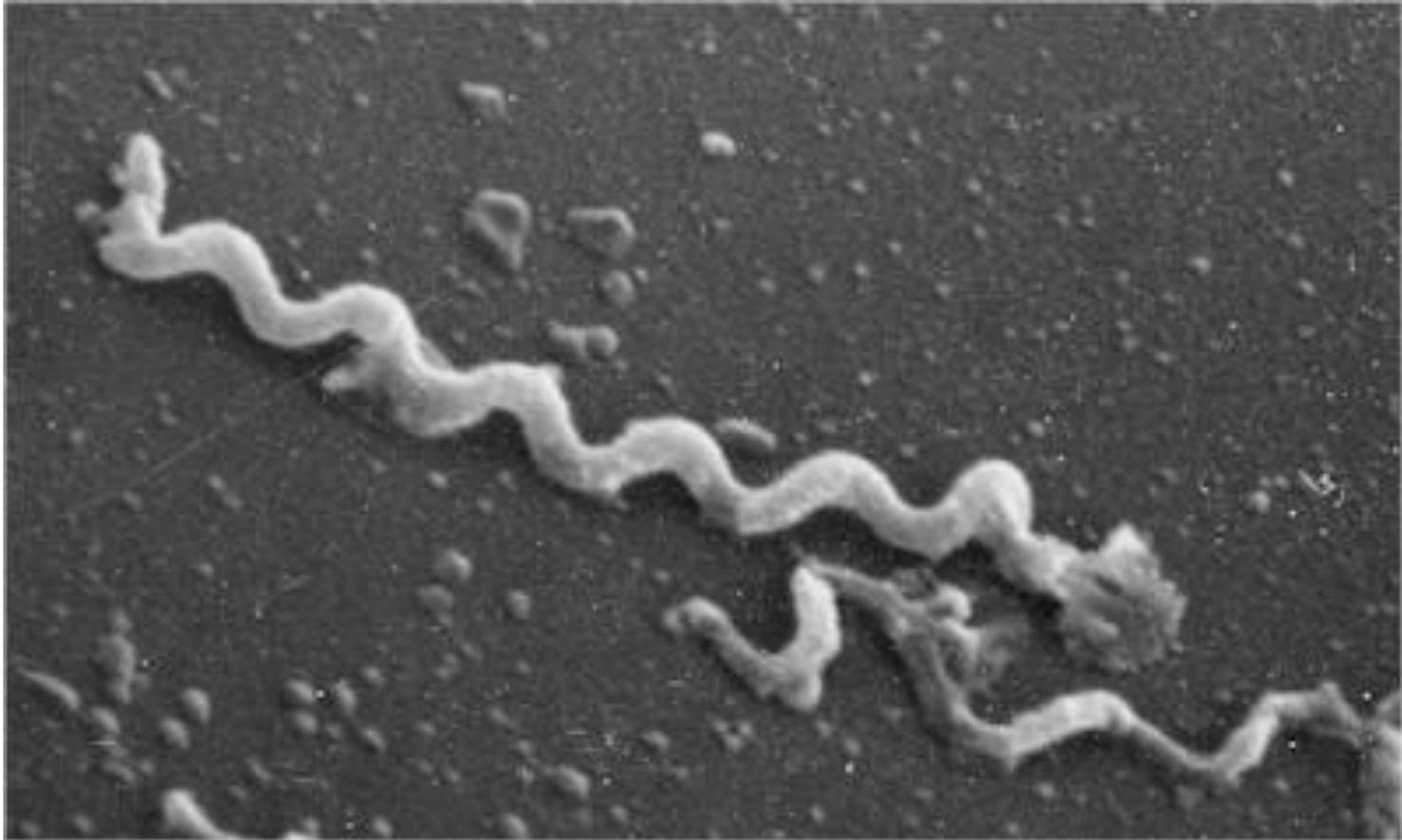


Трепонемы в темном поле

зрения



Трепонемы в электронном микроскопе



Культивирование *T.pallidum*

Бледная трепонема не растет на искусственных питательных средах, ее культивируют, заражая кроликов-самцов в ткань яичка, где развивается воспалительный процесс (орхит) и накапливается большое количество вирулентных «тканевых» трепонем.



Периоды заболевания сифилисом

Классическое течение сифилиса в виде первичного, вторичного и третичного периодов наблюдается у больных при отсутствии лечения.

В настоящее время сифилис излечивается в первичном или вторичном периоде.

Периоды заболевания сифилисом

Первичный период – твердый шанкр образуется в области входных ворот инфекции – небольшая эрозия или язва на плотном основании (безболезненный воспалительный процесс).

В тканевом отделяемом содержится много трепонем. Через 3-4 недели в сыворотке больного появляются антитела.



Периоды заболевания сифилисом

Вторичный сифилис продолжается 2-3 года.

В результате генерализации инфекции в процесс вовлекаются кровеносные сосуды, лимфатическая система, внутренние органы, костная система, ЦНС.

Течение рецидивирующее, приступообразное.

На коже и слизистых оболочках появляются различные высыпания, содержащие множество трепонем. Высыпания продолжаются 1,5-2 месяца, затем исчезают и вновь появляются.

Серологические реакции на Ат положительные в течение всего периода.

Периоды заболевания сифилисом

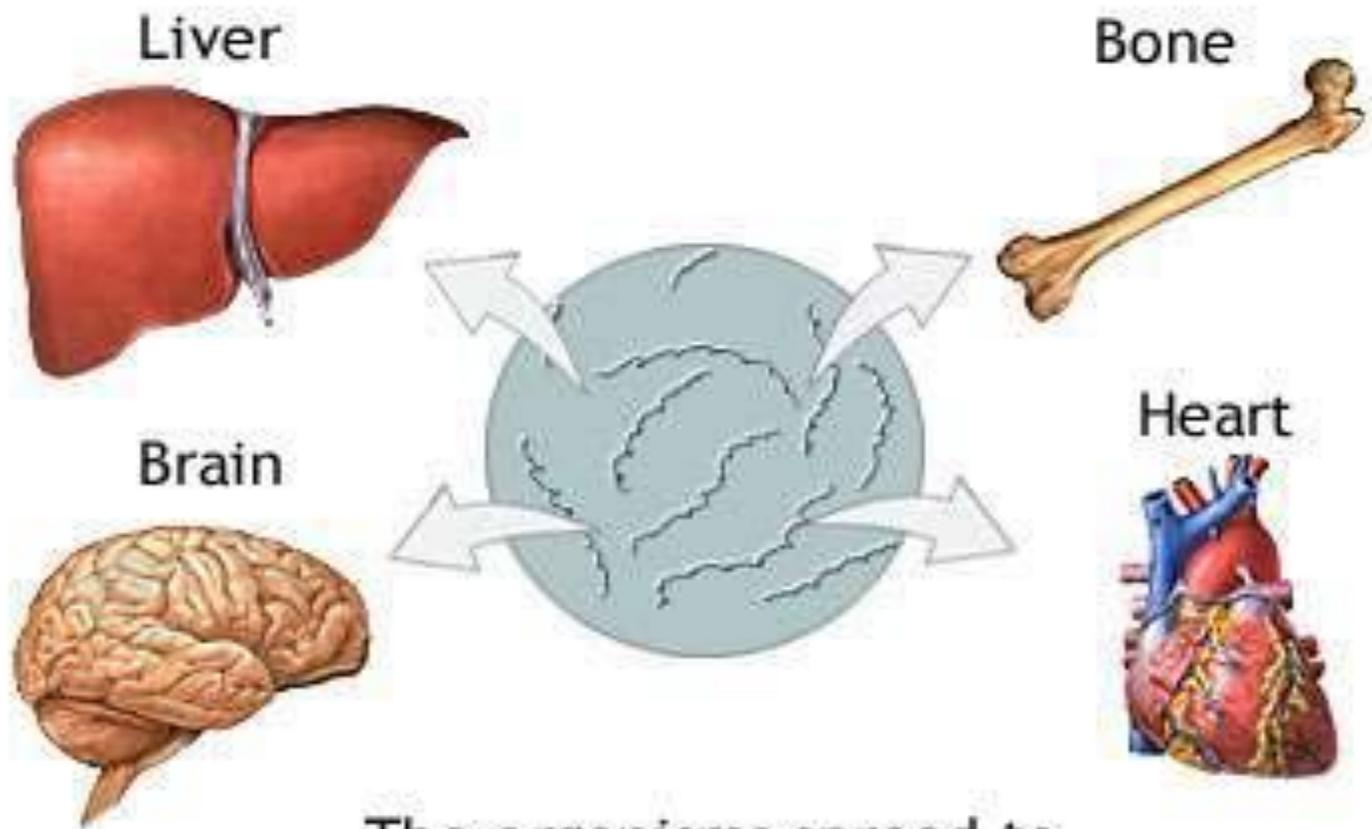
Латентный период – бессимптомный период, может длиться несколько лет

Периоды заболевания сифилисом

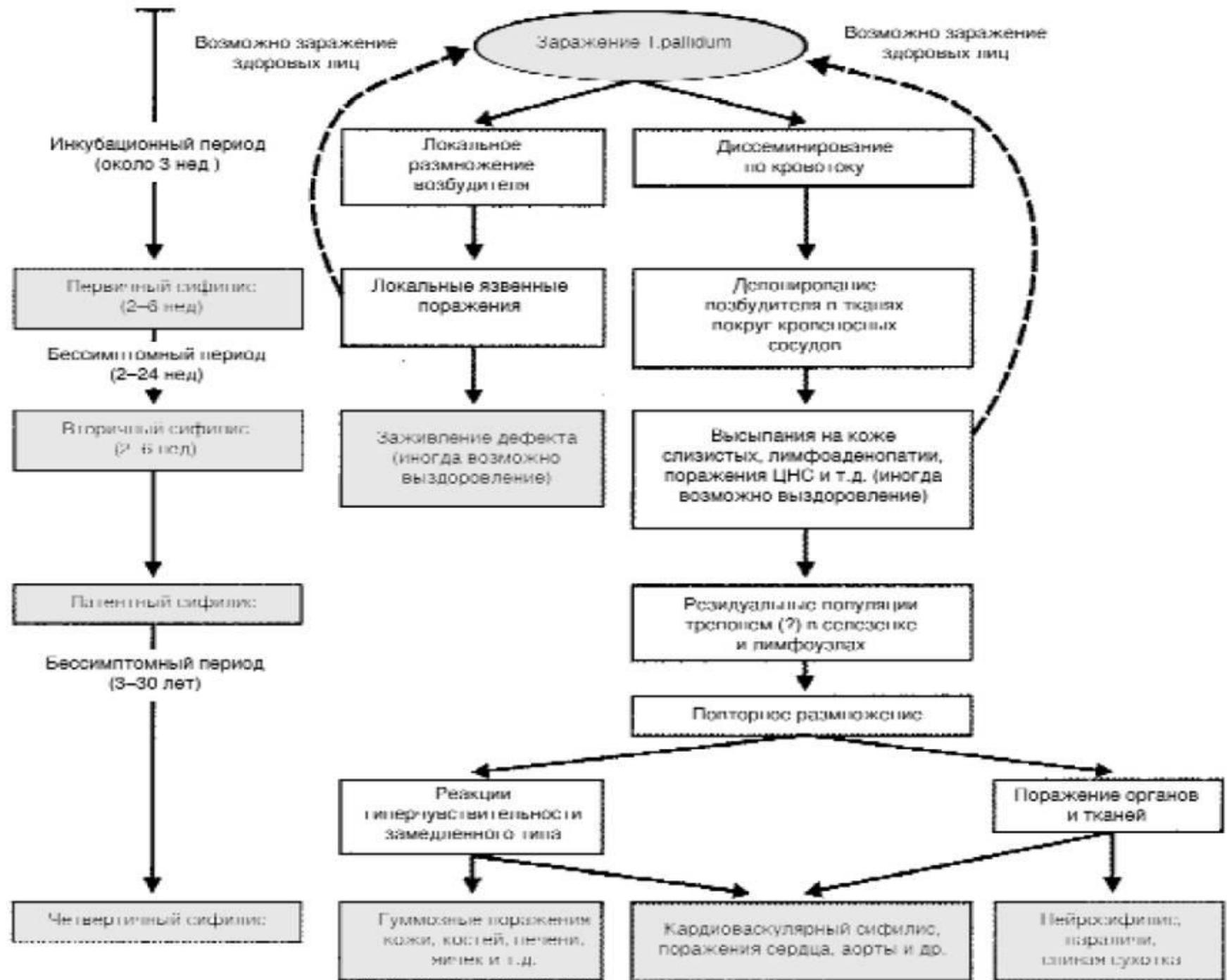
Третичный период – наиболее тяжелый, имеет рецидивирующее течение, продолжается многие годы. Трепонемы не всегда обнаруживаются. Развивается ГЗТ.

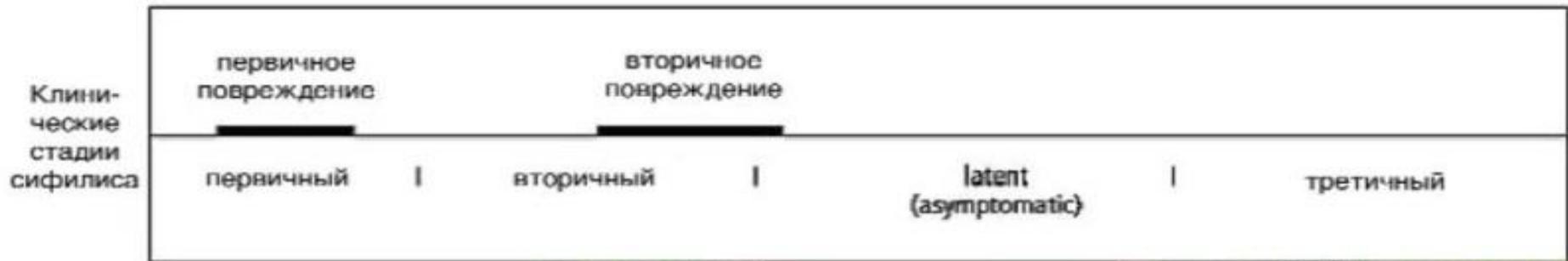
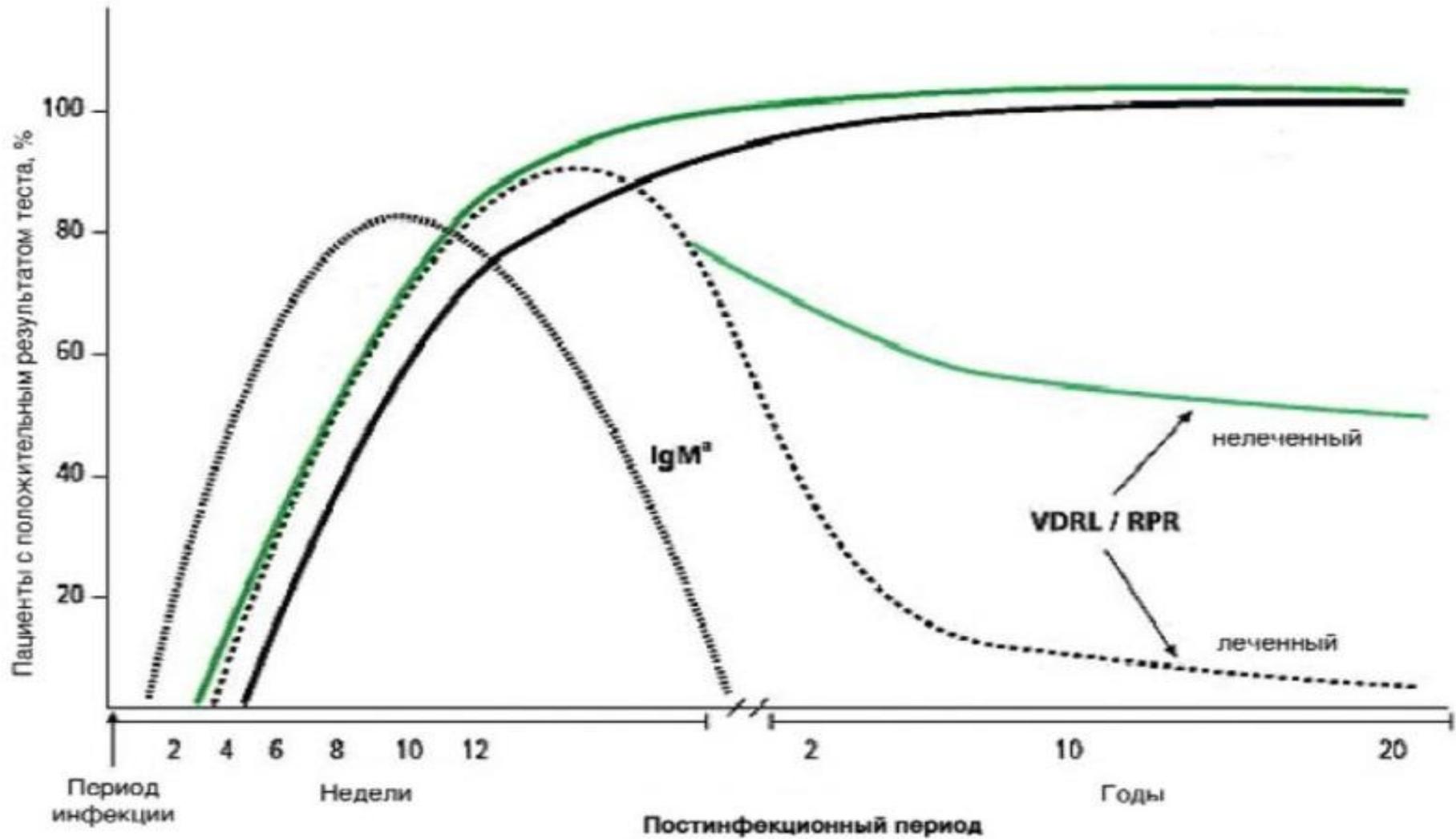
Для этого периода характерны сифилитические гранулемы – гуммы, они склонны к некрозу и распаду, при их заживлении образуются грубые втянутые рубцы и участки склерозированной ткани. Гуммы могут образовываться в любых органах и тканях, в том числе и жизненно важных.

Серологические реакции положительны менее чем у 70% больных.



The organisms spread to various organs causing lesions or gummas





Микробиологическая диагностика сифилиса

Методы диагностики:

- микроскопический
- серологический

Микробиологическая диагностика сифилиса

Микроскопическое исследование проводят в первичном и вторичном периоде сифилиса.

Исследуемый материал: отделяемое твердого шанкра, язв, эрозий, содержимое разных высыпаний на коже или слизистых оболочках и др.

Применяют метод иммунофлюоресценции, реже окрашивают препараты (метод импрегнации).

Антигены *T.pallidum*

- **Белковый антиген**, высокоиммуногенный, термостабильный. Антитела к нему появляются в конце инкубационного периода или в течение первой недели после появления твердого шанкра. Длительно сохраняются после излечения.
- **Полисахаридный антиген**, слабо иммуногенный, термостабильный. Антитела к нему в диагностике не имеют значения.

Антигены T.pallidum

- **Липидный «вездесущий» антиген**, иммуногенный, на его долю приходится около 30% сухого вещества клетки спирохеты. Имеет сходство с фосфолипидами митохондриальных мембран тканей человека.

Антитела к нему называются реагинами - они появляются на 5-6 неделе после заражения и исчезают после успешного лечения.

Серологическая диагностика сифилиса

Серологические реакции применяют для выявления **Ат**.

Они подразделяются на:

- неспецифические – выявляющие противOLIпидные Ат (реагины), в них используют неспецифический кардиолипиновый антиген.
- специфические – в них используют специфические трепонемные антигены.

Серологическая диагностика сифилиса

Серологическая диагностика сифилиса проводится в нашей стране согласно приказу № 87 МЗ РФ от 26.03.2001 г с применением следующих тестов:

- отборочные (скрининговые) тесты;
- подтверждающие тесты.

Отборочные серологические тесты

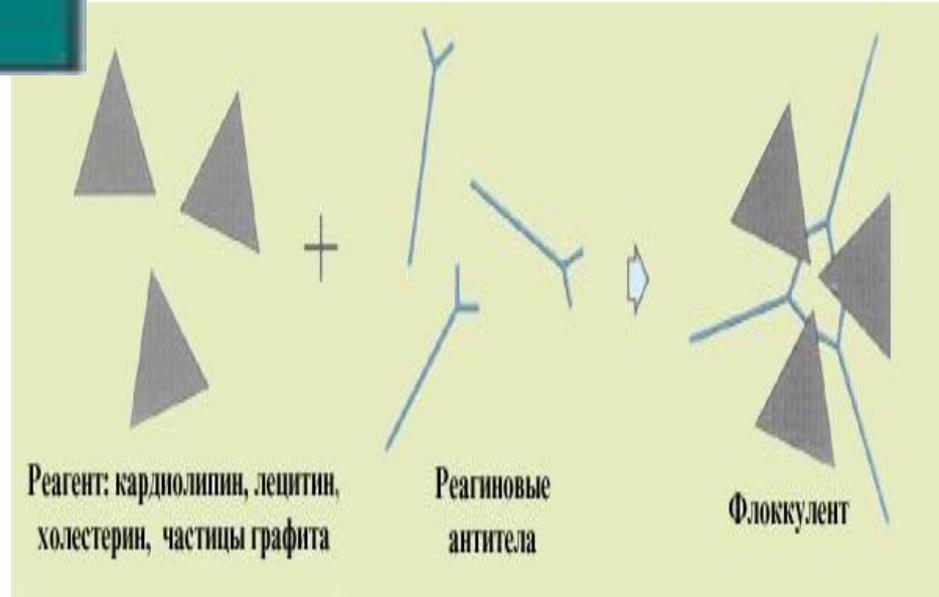
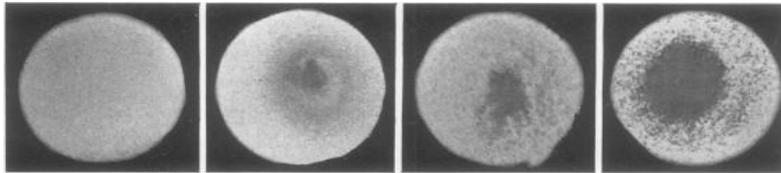
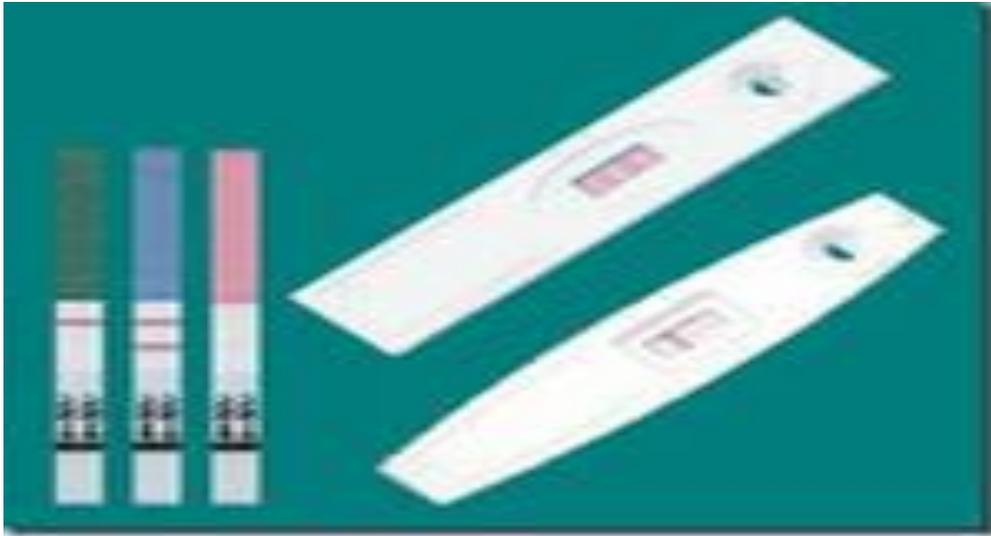
1. Реакция микропреципитации (РМП) или ее модификации (РПР и др.)

Их ставят с кардиолипиновым антигеном для

- подтверждения свежего сифилиса
- контроля эффективности лечения.

2. РПГА и ИФА - со специфическими трепонемными АГ , применяются как отборочные при исследовании лиц из групп риска, беременных и доноров.

Механизм реакции микропреципитации (РМП) с кардиолипиновым антигеном



Подтверждающие серологические тесты

1. РПГА (РНГА) – реакция пассивной (непрямой) гемагглютинации
2. ИФА – иммуноферментный анализ
3. Иммуноблотинг – при сомнительном результате РПГА или ИФА

Реакция непрямой гемагглютинации со специфическим трепонемным антигеном

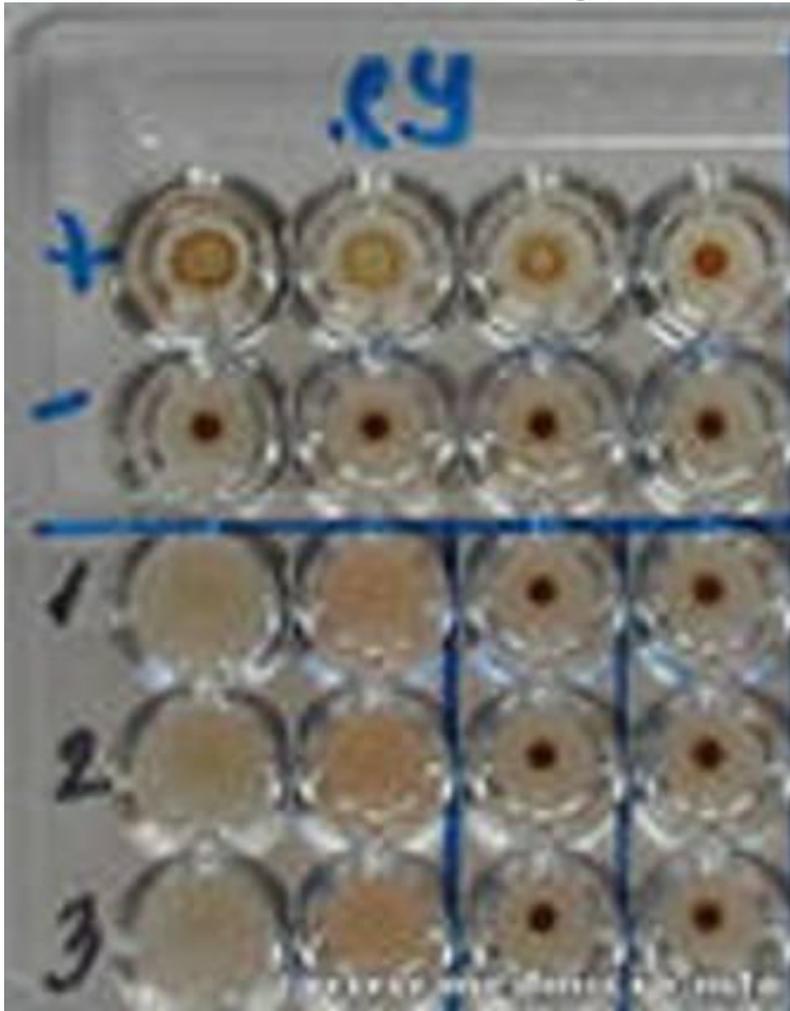
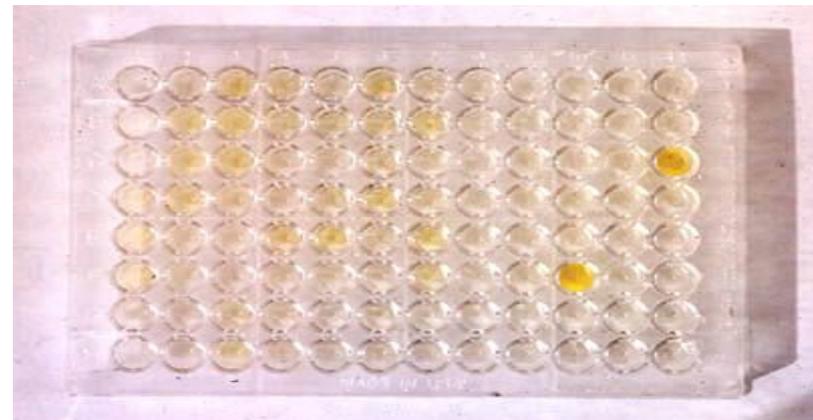
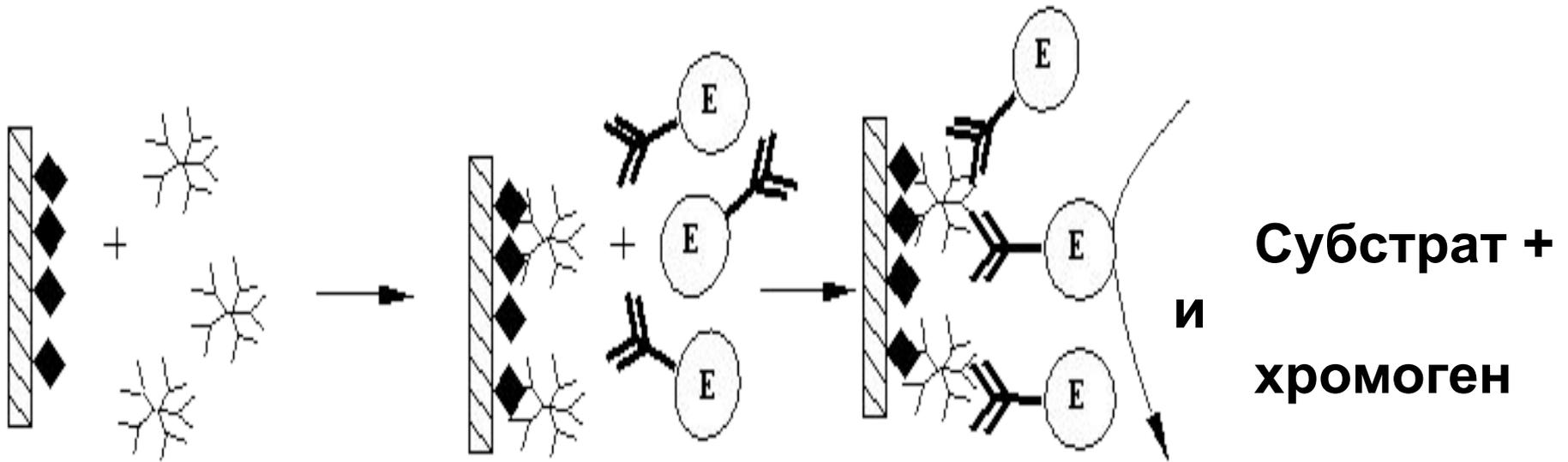


Схема ИФА для определения IgM



Подтверждающие серологические тесты

Эти реакций ставят в специализированных институтах и в качестве антигена используют **живые** тканевые T.pallidum штамма Никольс .

МИФ – метод иммунофлюоресценции
непрямой

РИТ – реакция иммобилизации трепонем

Метод иммунофлюоресценции непрямой



ПЦР – полимеразная цепная реакция.

Метод заключается в многократном увеличении количества ДНК диагностируемого микроорганизма.

С помощью данного анализа можно выявить

- врожденный сифилис,
- нейросифилис,
- первичный серонегативный сифилис,
- обнаружить сифилис у ВИЧ-инфицированных.

Подготовка к сдаче и время сдачи:

забор крови производится натощак в количестве 5-6 мл из локтевой вены.

ПЦР

Specimen
(Urine, Plasma, Serum,
Saliva, Milk, etc...)



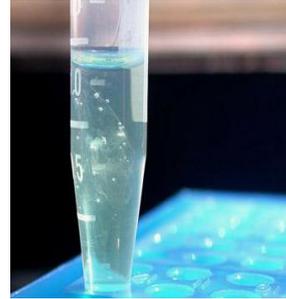
Nucleic Acid Isolation
(35 minutes)



PCR Amplification
(90 minutes)

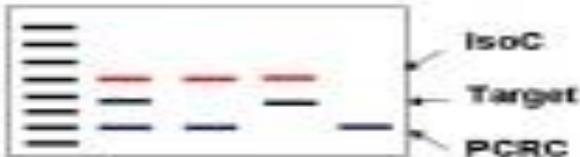


**Accurate and Sensitive Results
In few hours**

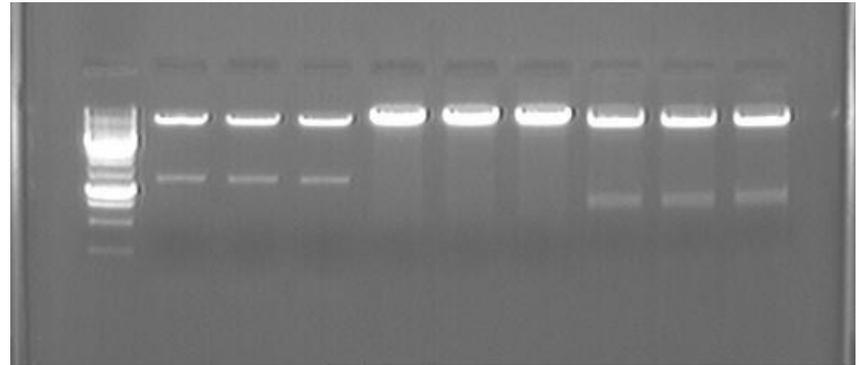


Two Options for Detection:

1) Agarose Gel



**2) Real-Time PCR
Melt Curve**



Биопрепараты для специфической профилактики и лечения

Специфическая
профилактика и
лечение
не разработаны.



ГОНОРЕЯ

- Гонорея – антропонозное венерическое заболевание, характеризующееся воспалением слизистых оболочек преимущественно урогенитальной системы, часто приобретает хроническое течение.

Таксономическое положение возбудителя гонореи

Семейство Neisseriaceae

Род Neisseria

Вид Neisseria gonorrhoeae
(N.gonorrhoeae)

Альбер Людвиг Нейссер (1855-1916)

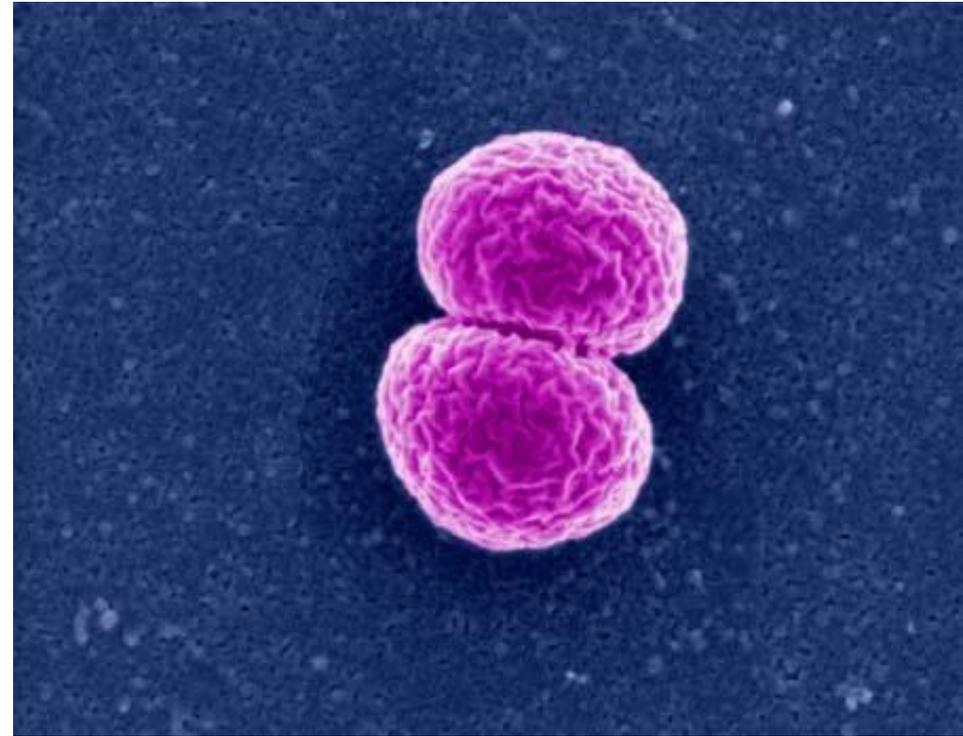


В 1879 г. немецкий врач-дерматолог А. Нейссер впервые обнаружил возбудителя гонореи - **Neisseria gonorrhoeae**

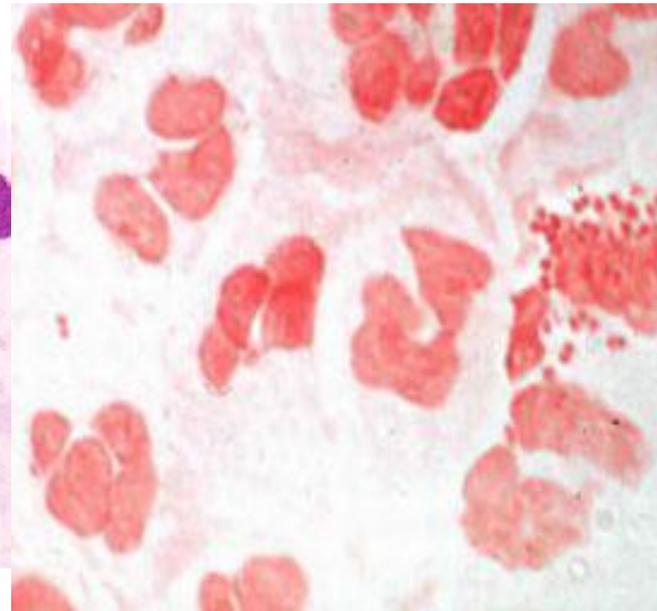
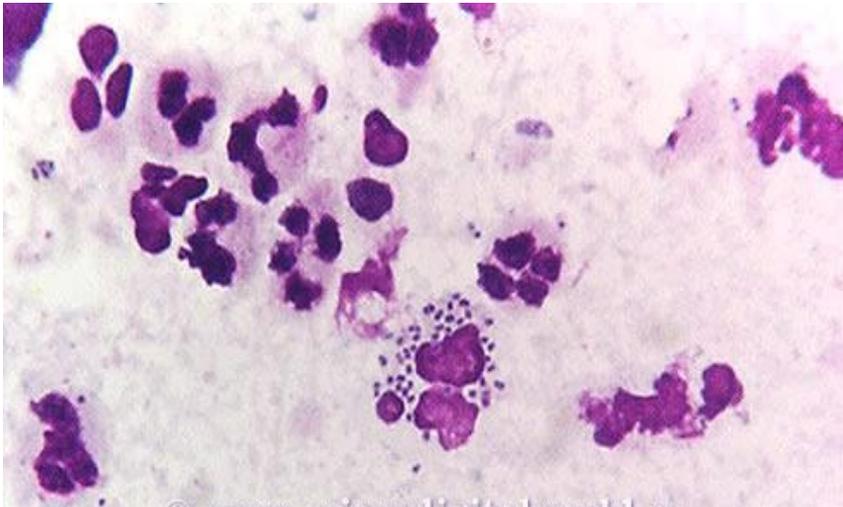
Морфология *N.gonorrhoeae*

Грамотрицательные
диплококки

бобовидной формы,
размеры 1,0-1,3 x
0,6-0,8 мкм,
неподвижные,
спор не образуют,
имеют пили,
в организме образуют
нежную капсулу



Гонококк в гное, окраска по Леффлеру (метиленовым синим) и по Граму



Культуральные свойства ГОНОКОККОВ

Растут на
питательных
средах с
добавлением
крови,
сыворотки,
асцитической
жидкости



Факторы патогенности гонококков

фактор	биологический эффект
Пили	адгезия на эпителиальных клетках влагалища, фаллопиевых труб и полости рта
капсула	антифагоцитарная активность
Por-протеин (АГ)	препятствует слиянию лизосом и фагосом
Ора - протеин	адгезия и инвазия
RMP- протеин	маскирует АГ
sIgA-протеаза	разрушает sIgA
ЛОС (АГ)	эндотоксин

Пути заражения

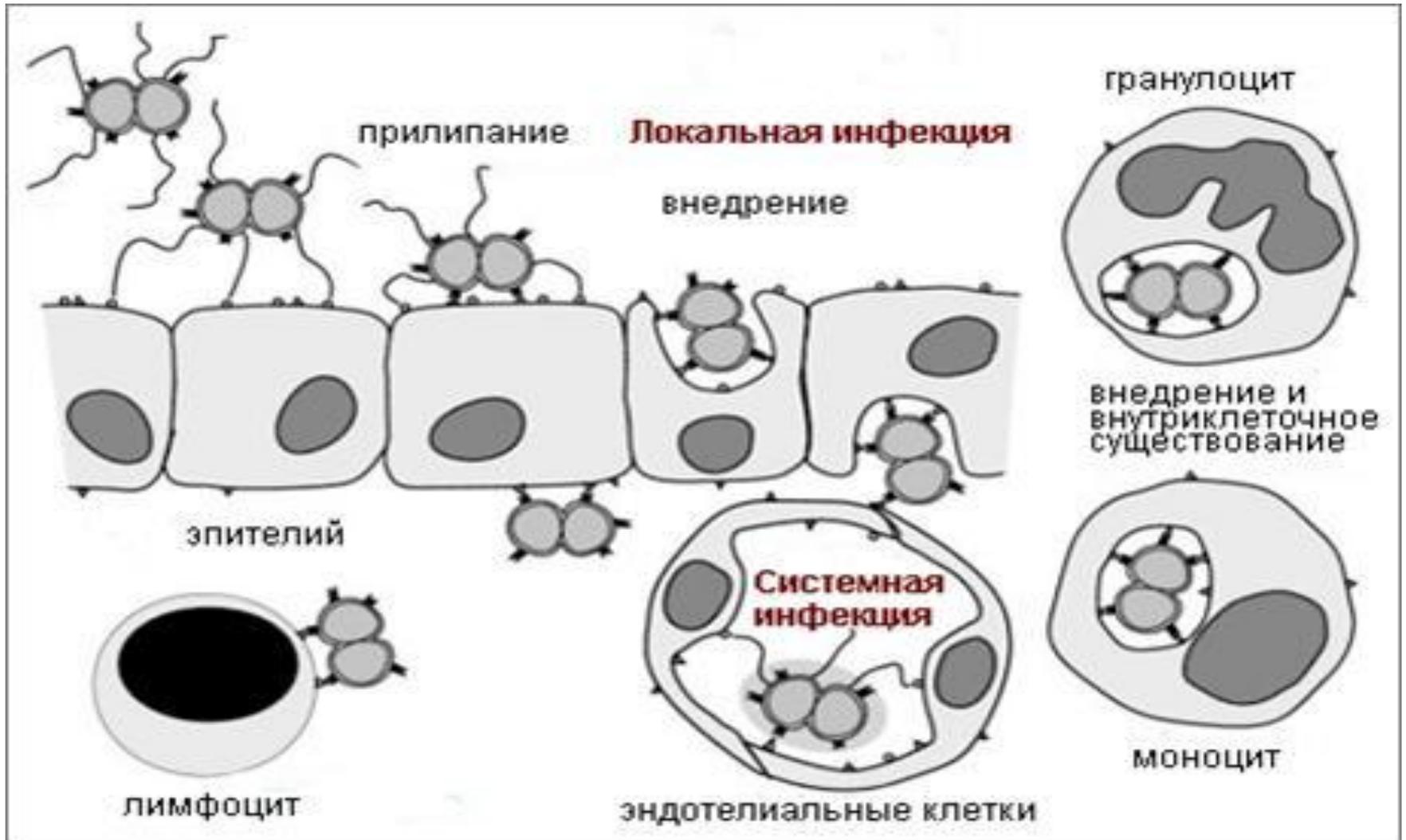
Пути заражения

гонококками:

- половой,
- вертикальный



Патогенез гонореи



Микробиологическая диагностика гонореи

Исследуемые материалы: гной из уретры, слизь из шейки матки, отделяемое других пораженных слизистых оболочек, осадок мочи, пунктат из суставов (при артрите), кровь.

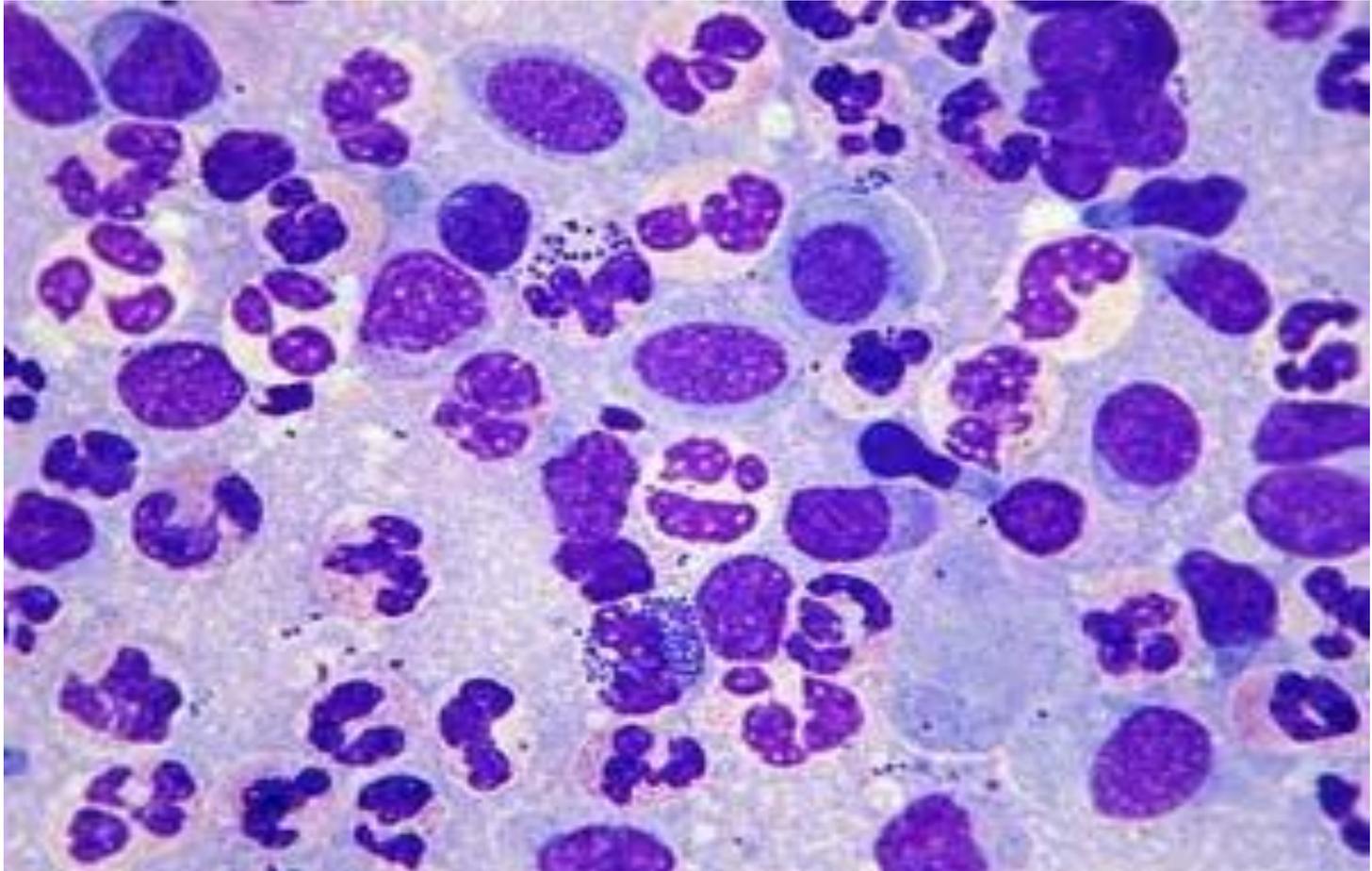
Методы диагностики

1. Микроскопический.
2. Бактериологический.
3. Серологические тесты для выявления Аг гонококка в клиническом материале – МИФ, ИФА.
4. Полимеразная цепная реакция – ПЦР.

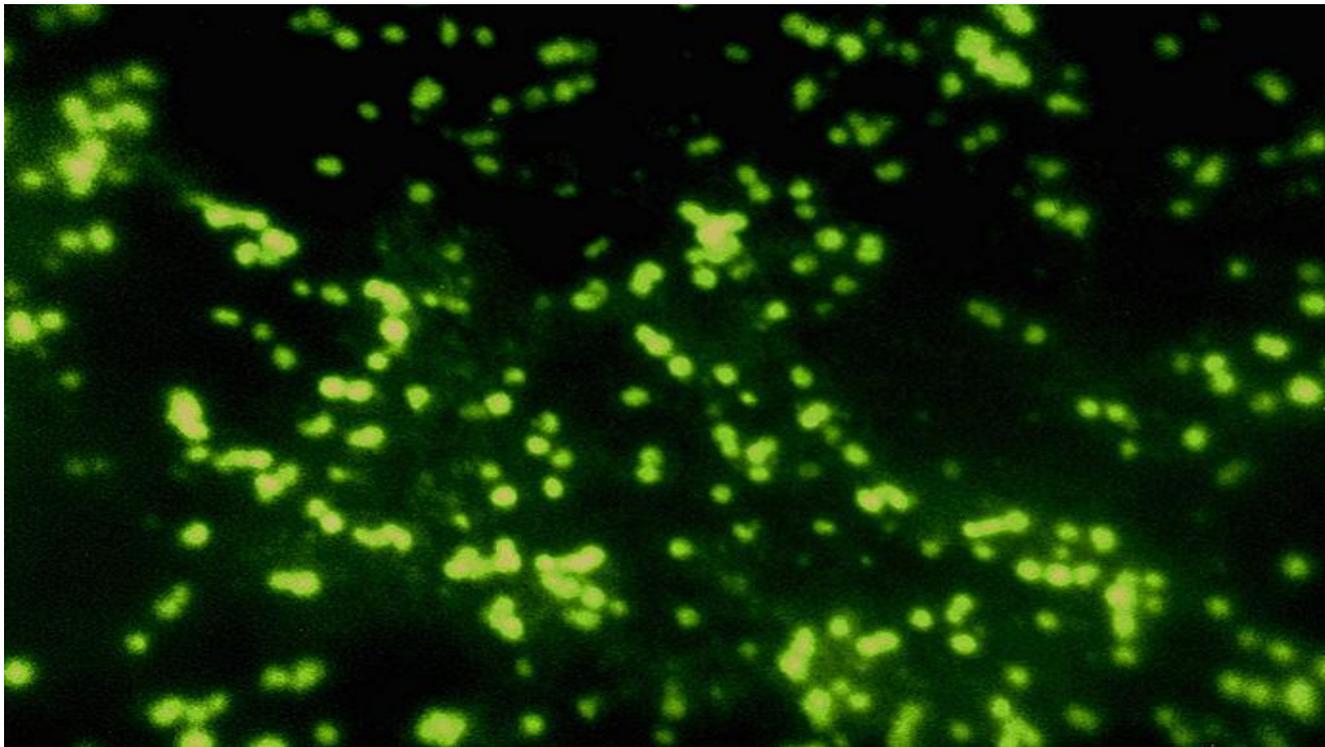
Микроскопическая диагностика острой гонореи

- Исследуемый материал (гной из уретры) красят по Граму и Лёффлеру.
- При положительном результате в поле зрения препарата видны многочисленные лейкоциты и диплококки бобовидной формы, расположенные преимущественно внутри лейкоцитов.
- При свежей острой гонорее этот метод является окончательным.

Микроскопический метод диагностики



Метод иммунофлюоресценции



Бактериологический метод диагностики гонореи

Исследуемый материал засевают на элективные питательные среды в чашки Петри, инкубируют при 37°C в атмосфере $10\% \text{CO}_2$ 2-5 суток. Выросшие колонии напоминают капли росы (вирулентные штаммы). Далее получают чистую культуру, которую идентифицируют по морфологическим, культуральным и биохимическим свойствам, определяют чувствительность к антибиотикам.



Биопрепараты для специфической профилактики и лечения гонореи

- Гонококковая вакцина –
инактивированная вакцина, лечебная

Урогенитальный хламидиоз

Урогенитальный хламидиоз

антропонозное инфекционное заболевание,
(возбудитель - **Chlamydia trachomatis**)
передающееся половым путем и
характеризующееся многочисленными
поражениями разных органов и тканей
мочеполовой системы, часто приобретает
хроническое течение.

Станислав Провачек



Польский
учёный
Станислав
Провачек
впервые
обнаружил
хламидии в
1907 году.

Таксономическое положение хламидий

порядок Chlamydiales

семейство Chlamydiaceae

- род Chlamydia

вид Chlamydia trachomatis (C.trachomatis)

УГС **C.trachomatis** – серовары D, Da, E, F, G, H, I, Ia, J, K.

- род Chlamydophila

Морфология хламидий

Хламидии – мелкие грамотрицательные прокариоты шаровидной или овоидной формы, не образуют спор, неподвижны, не имеют капсулы. В составе клеточной стенки отсутствует пептидогликан, ригидные функции выполняют белки наружной мембраны.

Хламидии существуют в двух формах:

Элементарное тельце (0,2-0,3 мкм) – внеклеточная инфекционная форма, ответственная за процесс прикрепления к клетке-мишени и проникновение в них.

Ретикулярное тельце (0,8-1,5 мкм)- внутриклеточная метаболически активная форма

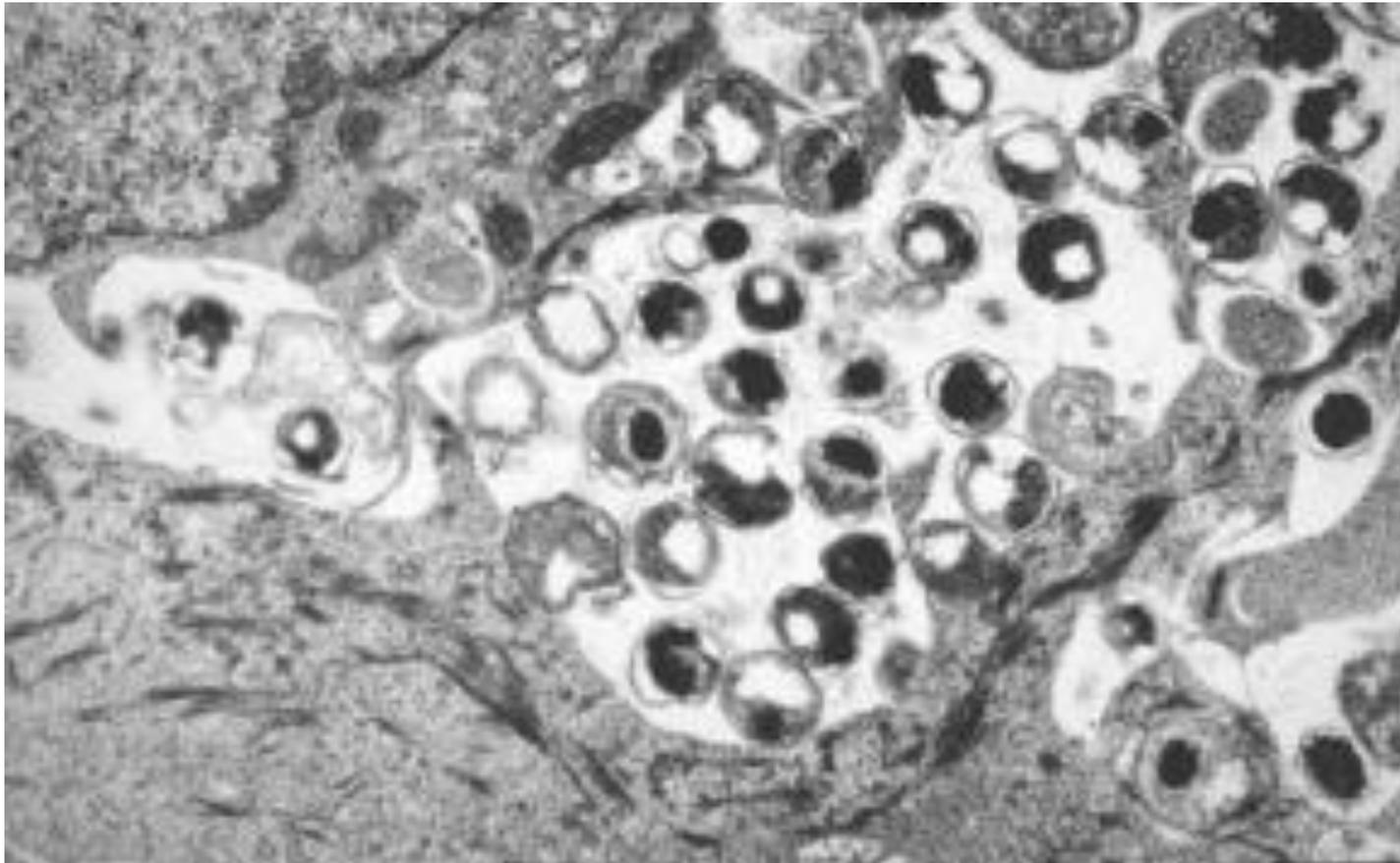
Методы изучения хламидий

Хламидии окрашиваются по методу Романовского-Гимзы. Цвет окраски зависит от стадии жизненного цикла:

ЭТ окрашивается в пурпурный цвет и четко выделяется на голубом фоне цитоплазмы клетки-мишени,

РТ окрашивается в голубой цвет.

Внутриклеточное включение при хламидиозе

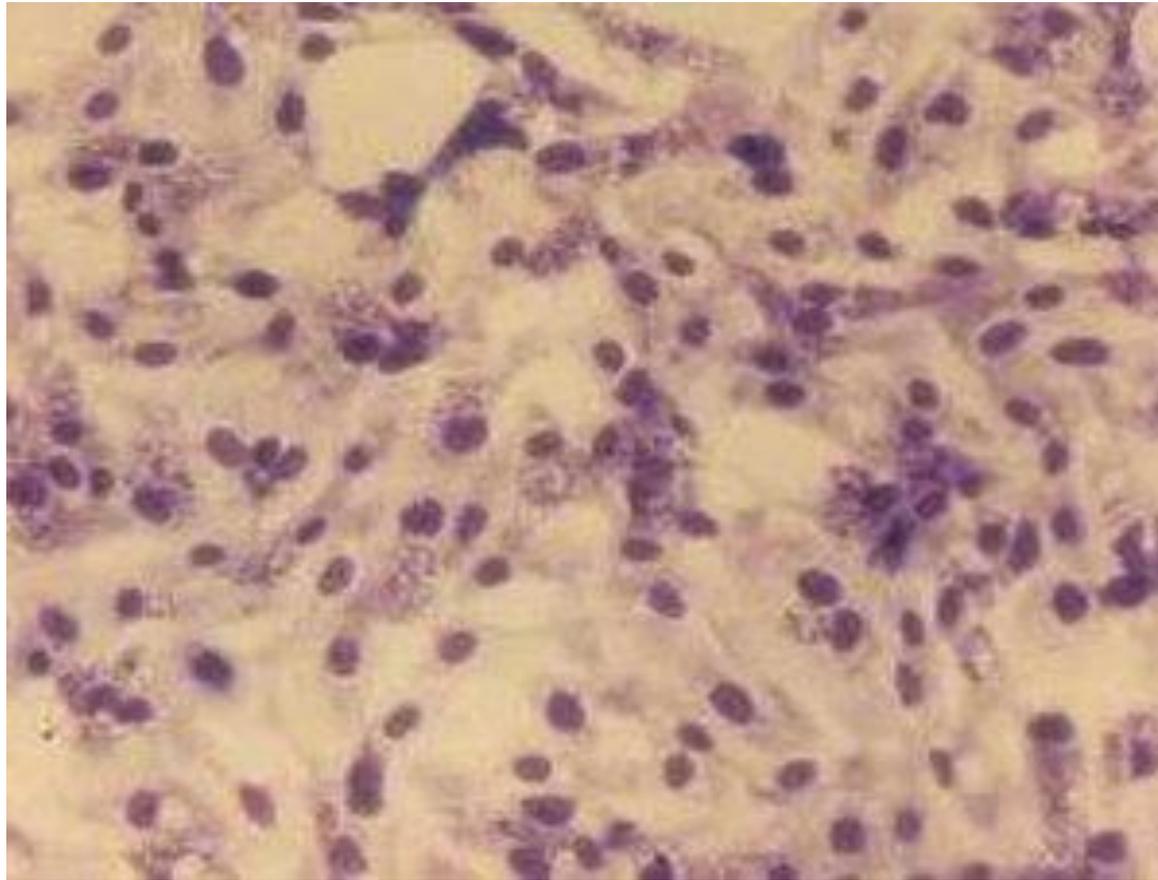


Культивирование хламидий

Хламидии являются облигатными внутриклеточными энергетическими паразитами, **не способны к синтезу АТФ**, поэтому не растут на искусственных питательных средах.

Хламидии культивируют в культуре клеток *HeLa*, *McCoу* и в желточных мешках куриных эмбрионов.

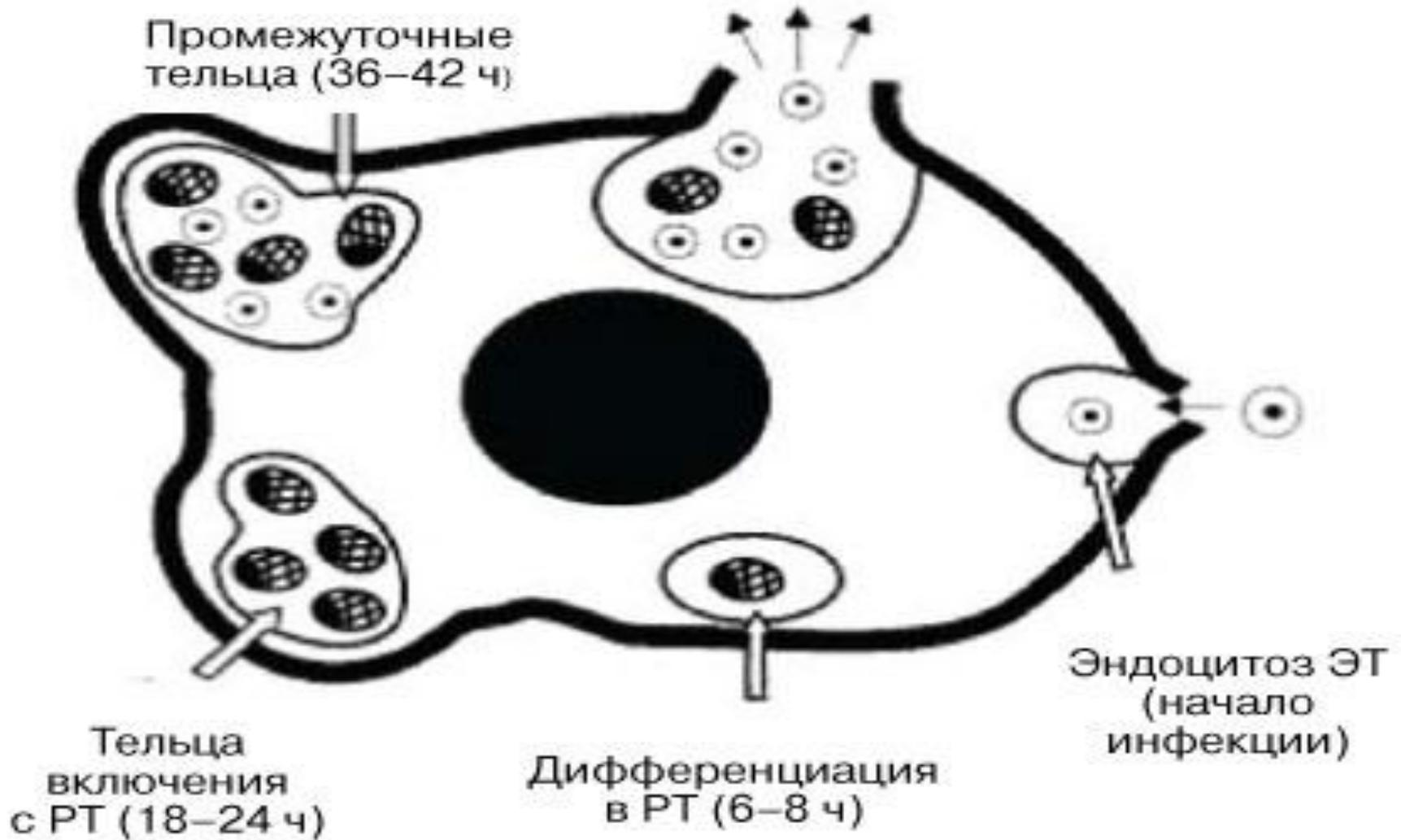
Однослойная культура клеток после инкубирования в присутствии *Chlamydia trachomatis*. Цитоплазма инфицированных клеток выглядит «гранулированной».



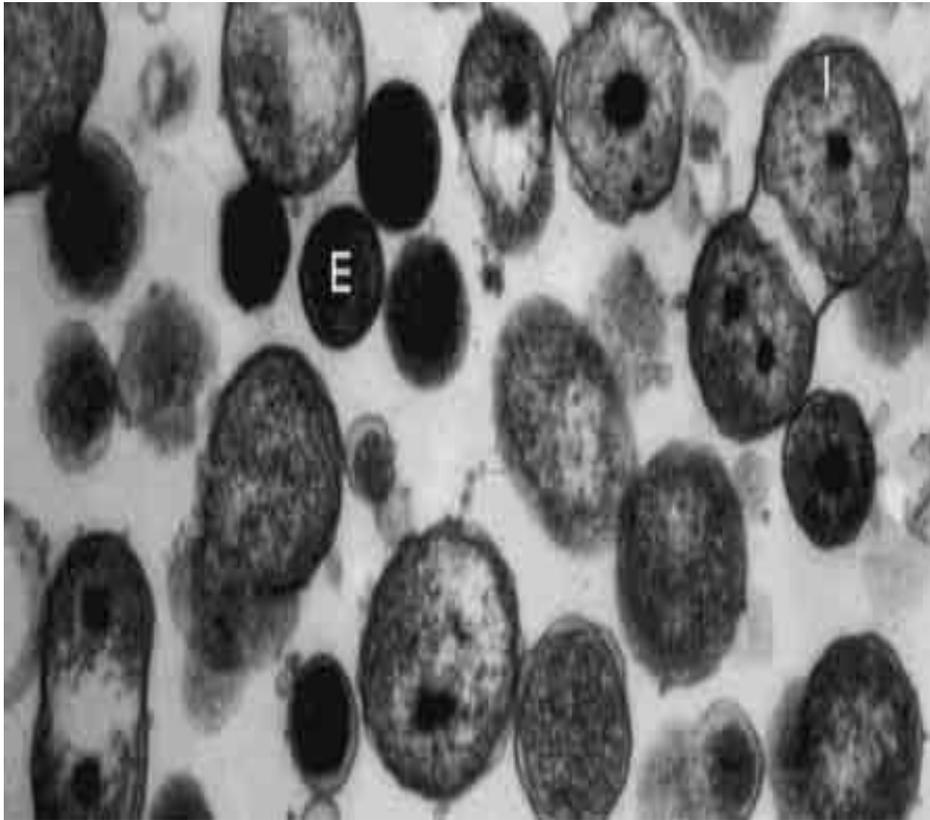
Жизненный цикл хламидий – (продолжительность 48-72 часа)

- 1.Адсорбция ЭТ на мембране клетки мишени и внедрение по типу эндоцитоза с образованием фагоцитарной вакуоли (7-10 часов).
- 2.Преобразование ЭТ в более крупное РТ, которое многократно делится бинарно, образуя хламидийные включения, окруженные мембраной клетки-хозяина (18-24 часа).
- 3.Созревание хламидий – образование промежуточных телец и трансформация РТ в ЭТ (36-42 часа).
- 4.Выход ЭТ из разрушенной клетки.
- 5.Проникновение ЭТ в новые клетки и начало нового цикла развития

Жизненный цикл хламидий



патогенез



ЭТ, внедряясь в клетку, использует для роста и размножения клеточную АТФ и через 6-8 часов превращается в РТ.

После инфицирования, через 18-22 ч. (РТ превр. в ЭТ)

патогенез

- В результате размножения *C. trachomatis* в инфицированных эпителиальных клетках развивается воспалительный процесс, выраженность которого зависит от состояния местного и общего специфического и неспецифического иммунитета организма.
- После инвазии хламидий образуется комплемент, который приводит к стимуляции гранулоцитов. Воспалительная реакция сопровождается локальной гибелью клетки и разрушением ткани, что дополняется высвобождением фосфолипазы A_2 и простагландинов, это приводит к отеку и гиперемии слизистой оболочки, нарушению целостности эпителиального слоя с частичной десквамацией эпителия.

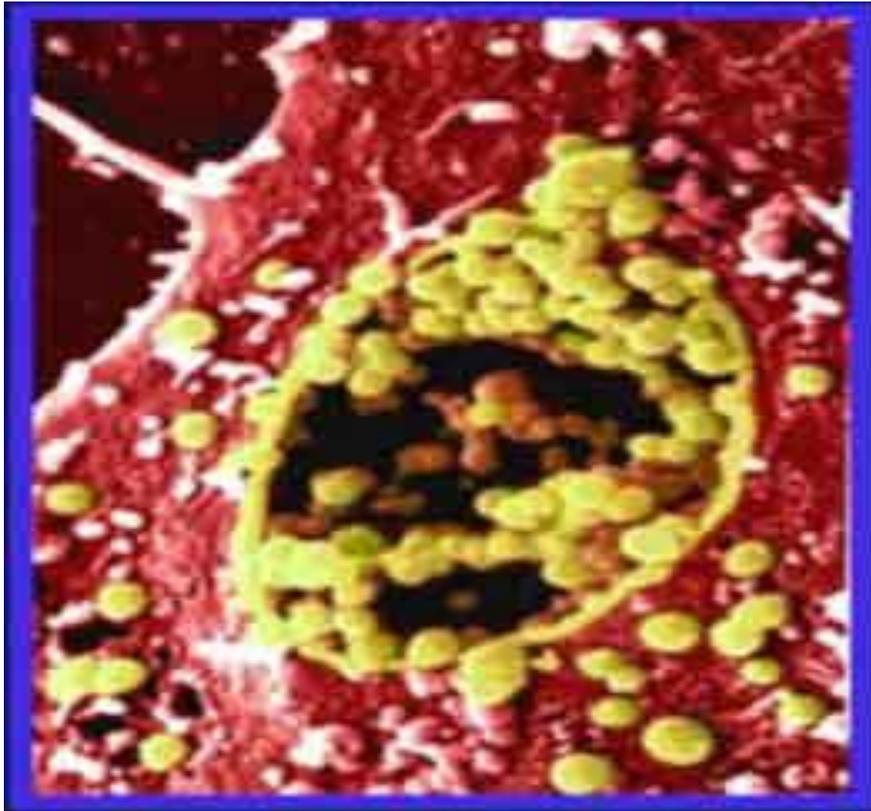
патогенез

- Превращение РТ в ЭТ требует не только энергии, но зависит от присутствия биологических субстратов, среди которых важнейшее место занимает аминокислота триптофан.
- В процессе воспаления лимфоциты выделяют разнообразные цитокины (в т. ч. интерферон g), который индуцирует клеточный фермент индоламин-диоксигеназу (ИДО), разрушающий триптофан. Уменьшение триптофана приводит или к гибели хламидий, или к замедлению процессов репликации (клеточного деления), и в эпителиальной клетке начинают накапливаться неинфекционные, неделящиеся РТ.

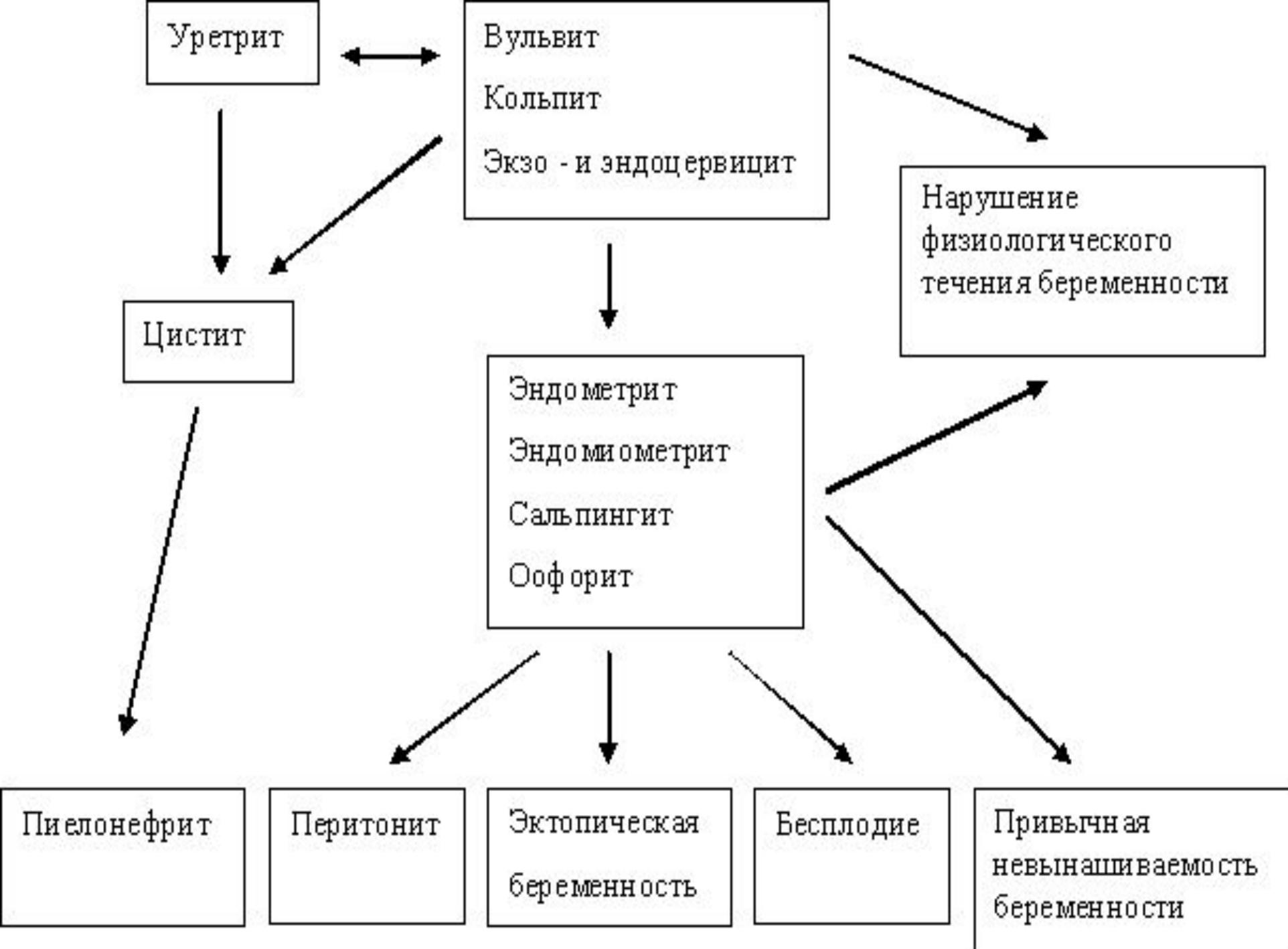
патогенез

- Цикл развития хламидий приостанавливается, но, несмотря на неблагоприятные условия, РТ сохраняют свою жизнеспособность (персистируют).
- Дальнейшее развитие и исход этого состояния зависят от продолжительности и уровня содержания триптофана.
- Уменьшение содержания интерферона α и, соответственно, увеличение внутриклеточного пула триптофана приводят к редифференцировке персистирующих форм в инфекционные ЭТ, их выходу из клетки и продолжению инфекционного процесса.
- Хламидии могут высвобождаться из инфицированной клетки, сохраняя жизнеспособность клетки (при выходе ЭТ путем экзоцитоза), что приводит к бессимптомному течению.

Внутриклеточное включение, содержащее размножающиеся хламидии



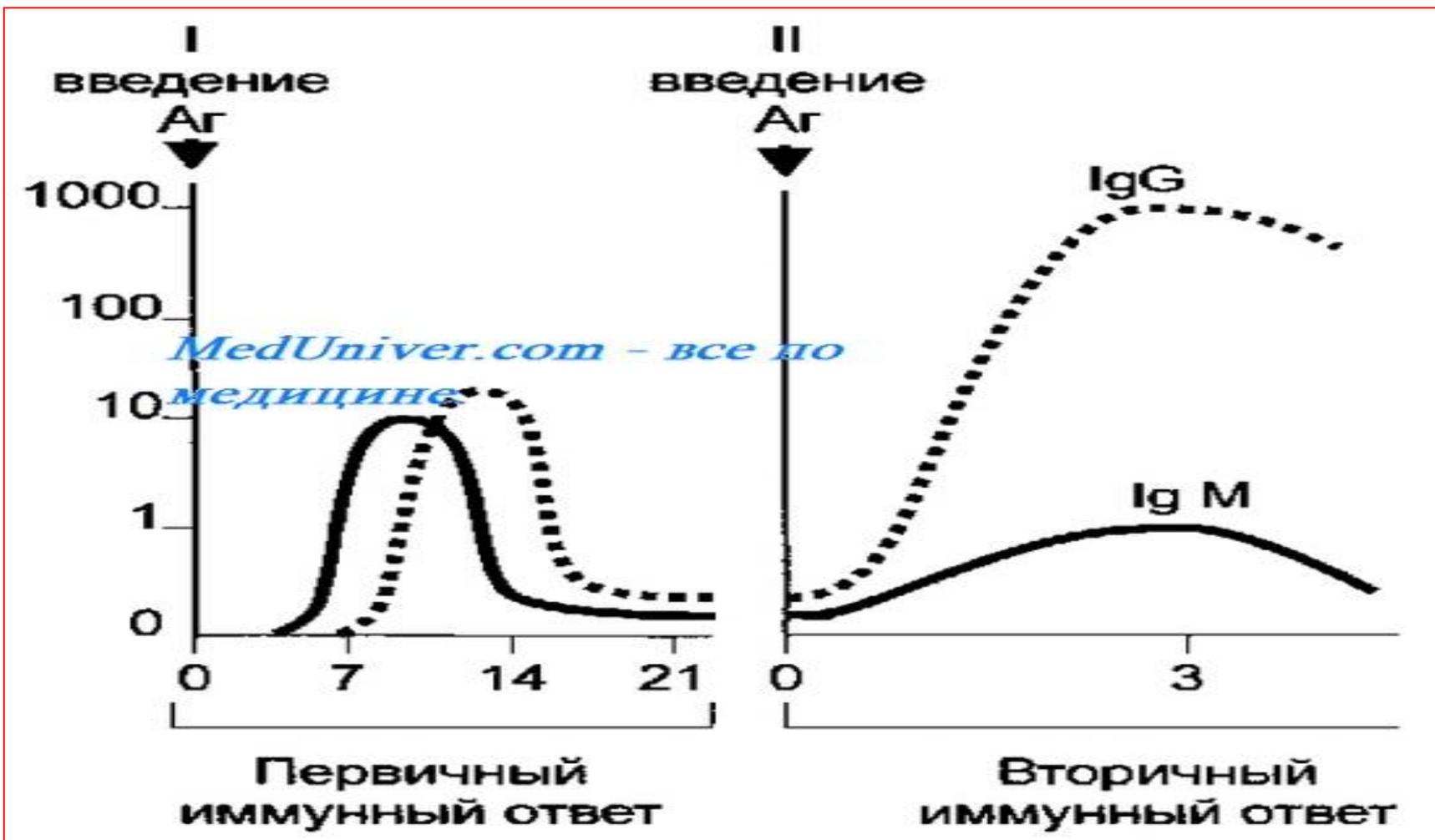
При возникновении неблагоприятных биохимических условий продолжительность жизненного цикла может значительно увеличиваться.



Антигены хламидий (по Р.А. Mardh, 1990)

Антиген	Химический состав	Примечание
Родоспецифический (общий для всех видов хламидий. Chlamydia psittaci, Chlamydia trachomatis, Chlamydia pneumoniae)	Липополисахарид	Три различных антигенных домена <u>Используются в диагностике иммунофлуоресцентным методом</u>
Видоспецифический (различен для всех видов хламидий Chlamydia psittaci, Chlamydia trachomatis. Chlamydia pneumoniae}	Белки наружной мембраны	Более 18 различных компонентов 155 кДа у Chlamydia trachomatis, эпитопы в белке 40 кДа, белок теплового шока hsp-60
Типоспецифический (различен для сероваров Chlamydia trachomatis)	Белки наружной мембраны	Эпитопы в 40 кДа протеине (MOMP), протеине 30 кДа у серотипов А и В

Формирование иммунного ответа



Иммунитет

- Защитная реакция на начальной стадии инфекции осуществляется полиморфоядерными лимфоцитами
- Существенную роль в защите организма играет поликлональная активация В-лимфоцитов. В сыворотке крови и секреторных жидкостях при хламидиозе обнаруживают значительное количество иммуноглобулинов IgG, IgM, IgA к хламидийному липополисахаридному антигену.
- Показано локальное образование секреторного иммуноглобулина А;
- Ведущую роль в защите от хламидийной инфекции занимают Т-хелперы, активирующие фагоцитарную активность макрофагов и цитотоксическую защиту посредством Т-лимфоцитов;

Микробиологическая диагностика урогенитального хламидиоза

Исследуемый материал: соскобы эпителия
слизистых уретры, цервикального канала,
сыворотка крови.

Методы диагностики:

Метод иммунофлюоресценции прямой

ПЦР – самый чувствительный метод
исследования

Серологический – выявляют специфические
антитела в сыворотке больных в **РНГА, ИФА,**
МИФ непрямой.

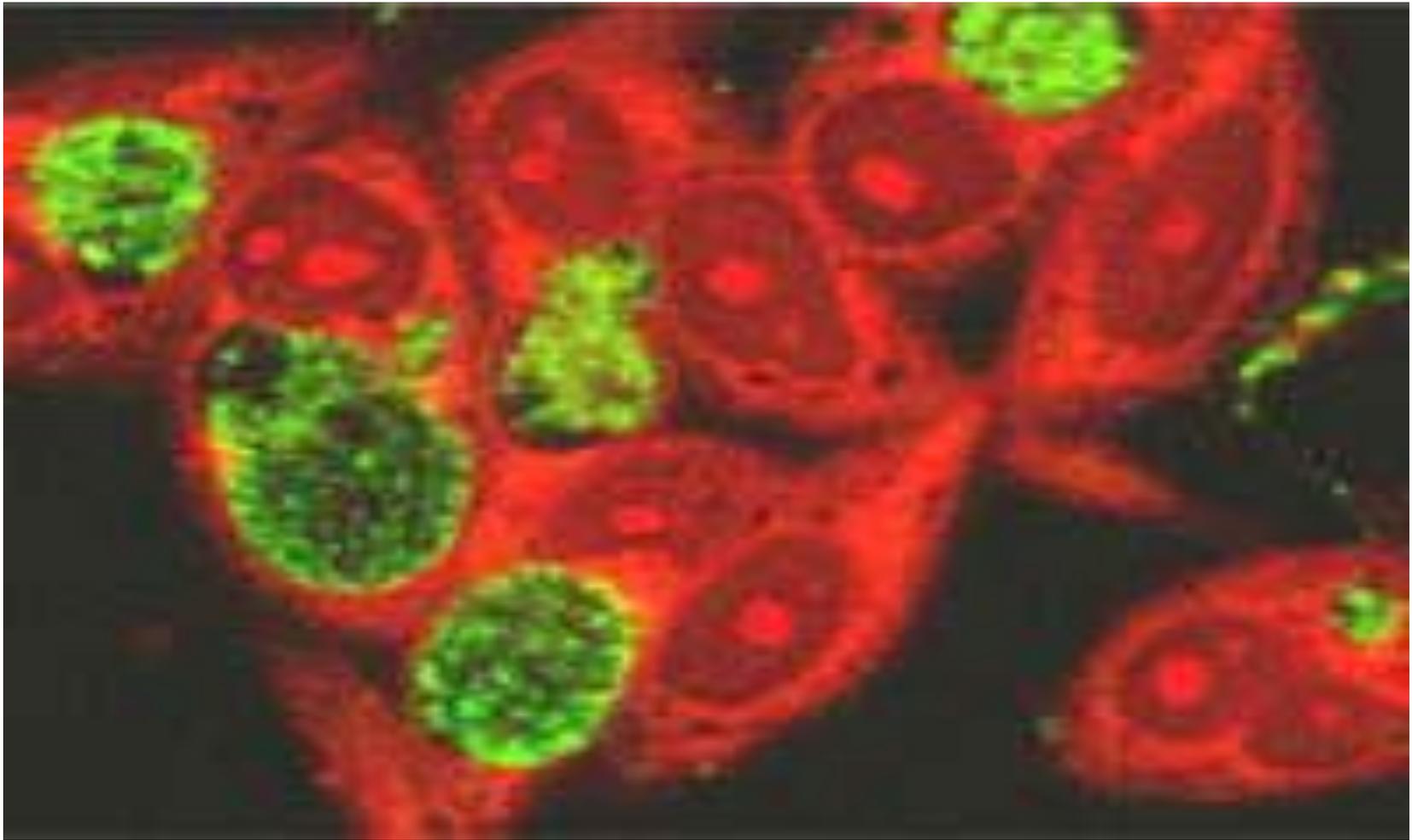
Культуральный метод – трудоемкий и
длительный, используют культуры клеток.

Транспортная система для хранения
клинического материала (до 72 час.)
при диагностике урогенитального хламидиоза



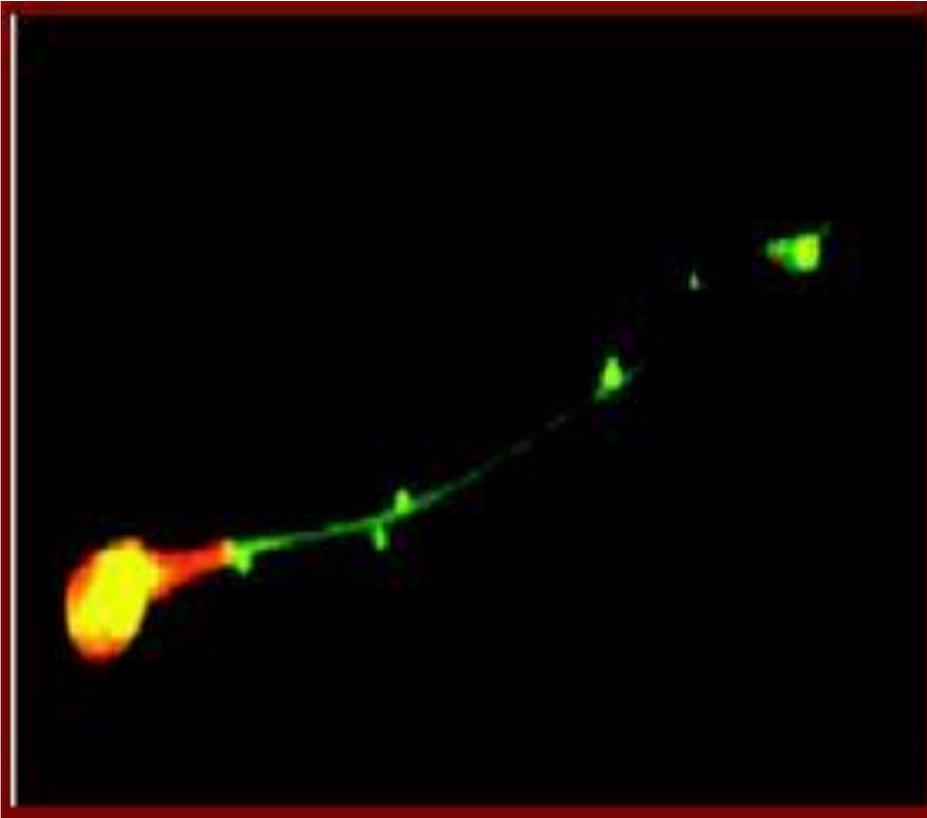
ПЦР в диагностике урогенитального хламидиоза – механизм ПЦР





C.trachomatis в пораженных клетках методом
прямой иммунофлюоресценции – зеленые
включения

Метод иммунофлюоресценции

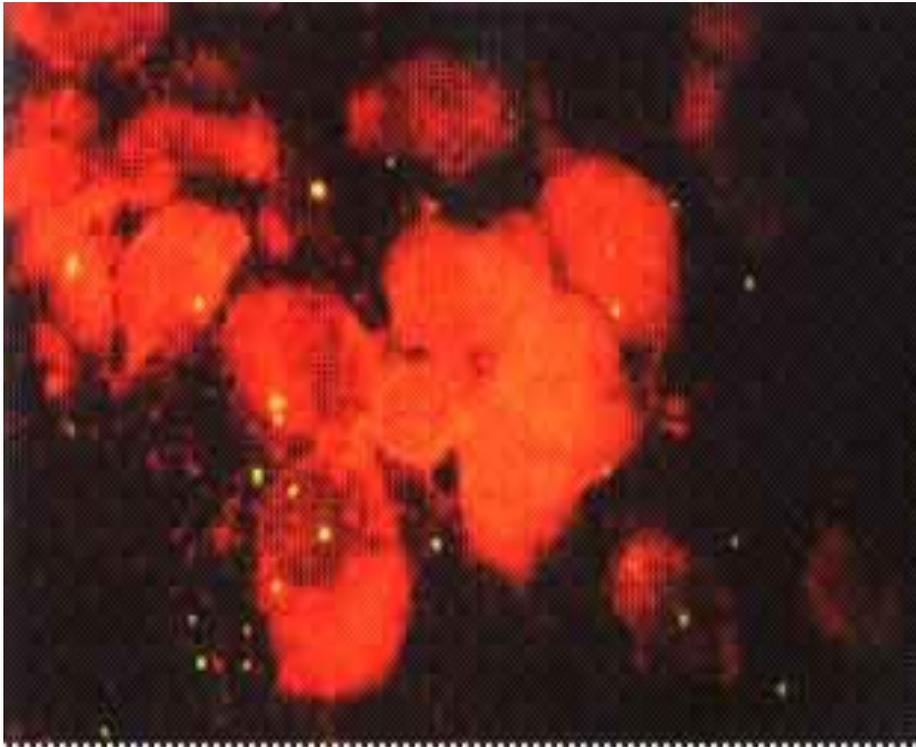


**Элементарные
тельца хламидий
(ярко зеленый
цвет) в
человеческой
сперме
(Courtney S.)**

ИФА схема исследования для диагностики хронического урогенитального хламидиоза



Культуральный метод



Элементарные тельца *C.trachomatis* светятся зеленовато-желтым цветом.

Эпителиальные клетки – хозяина характеризуются красным цветом.
(Х. Хансфилд)

Биопрепараты для специфической профилактики и лечения урогенитального хламидиоза

- Не разработаны

МИКПЛАЗМОЗЫ

Антропонозные инфекции, часто протекающие бессимптомно.

Таксономическое положение МИКОПЛАЗМ

класс Mollicutes

Патогенные микоплазмы включены в
подсемейство Mycoplasmataceae:

содержит 2 рода: Mycoplasma и Ureaplasma.

Виды:

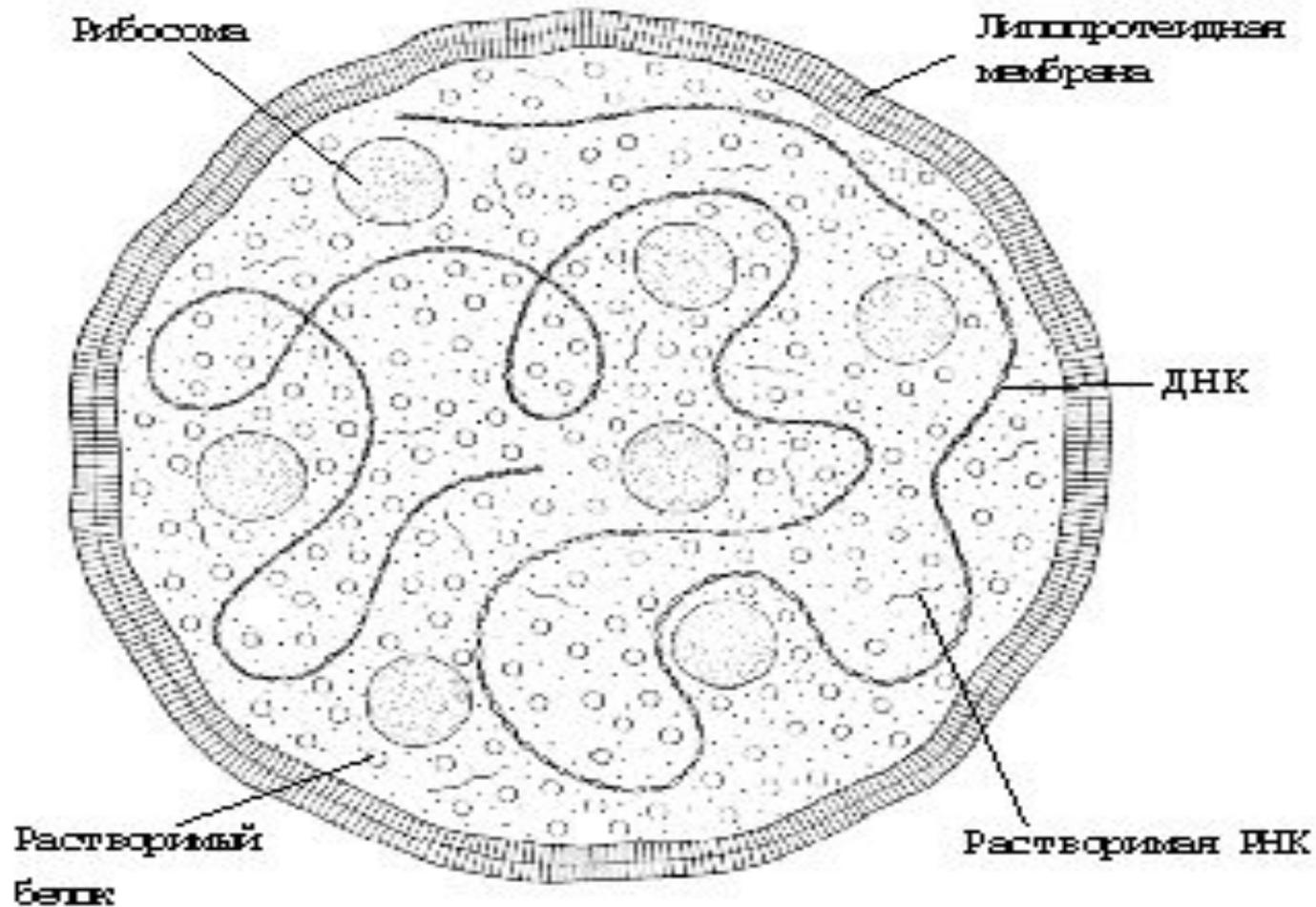
респираторные - M.pneumoniae

урогенитальные - M.hominis, M.genetalium,
U.urealiticum

Морфология микоплазм

- поверхностная оболочка микоплазм представлена ЦПМ. Она более прочная чем у бактерий, что связано с присутствием в ней холестерина;
- не имеют мезосом;
- имеют самый маленький размер генома среди всех саморепродуцирующихся живых клеток – $0,4-0,5 \times 10^9$ Д (у бактерий - $1-3 \times 10^9$ Д).
- вокруг крупных форм иногда образуется мукозный слой, подобный капсуле (липидный, полисахаридный или липополисахаридный)

Морфология микоплазм

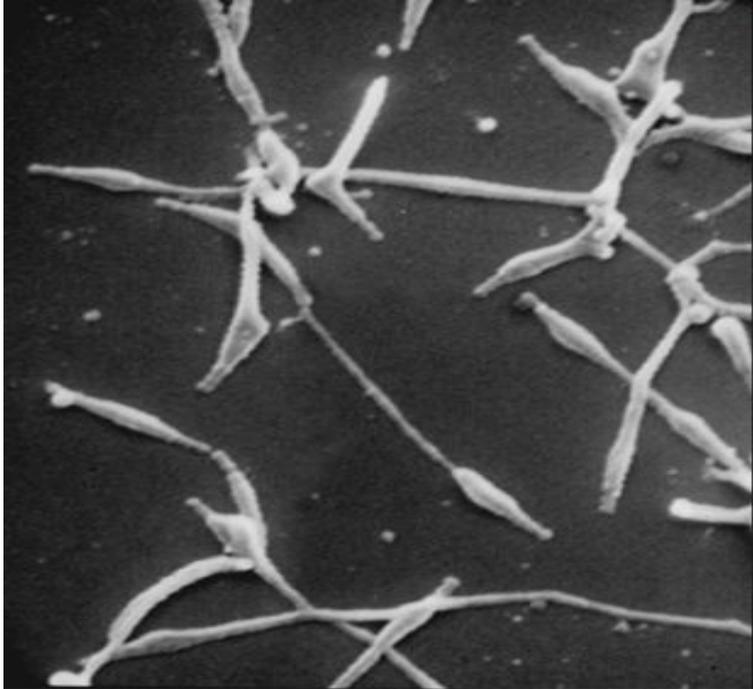


Морфологические формы микоплазм

Микоплазмы лишены ригидной клеточной стенки (формообразующей структуры), поэтому они полиморфны:

- крупные шаровидные тела диаметром до 10 мкм.;
- мелкие зерна «элементарные тельца» меньше 0,1-0,2 мкм.;
- нитевидные, иногда ветвящиеся формы, подобные мицелиям – длиной до 150 мкм диаметром до 0,3 мкм.;
- грушевидные, эллипсоидные, гантелевидные, шаровидные, палочковидные – различных размеров.

Морфологические формы МИКОПЛАЗМ



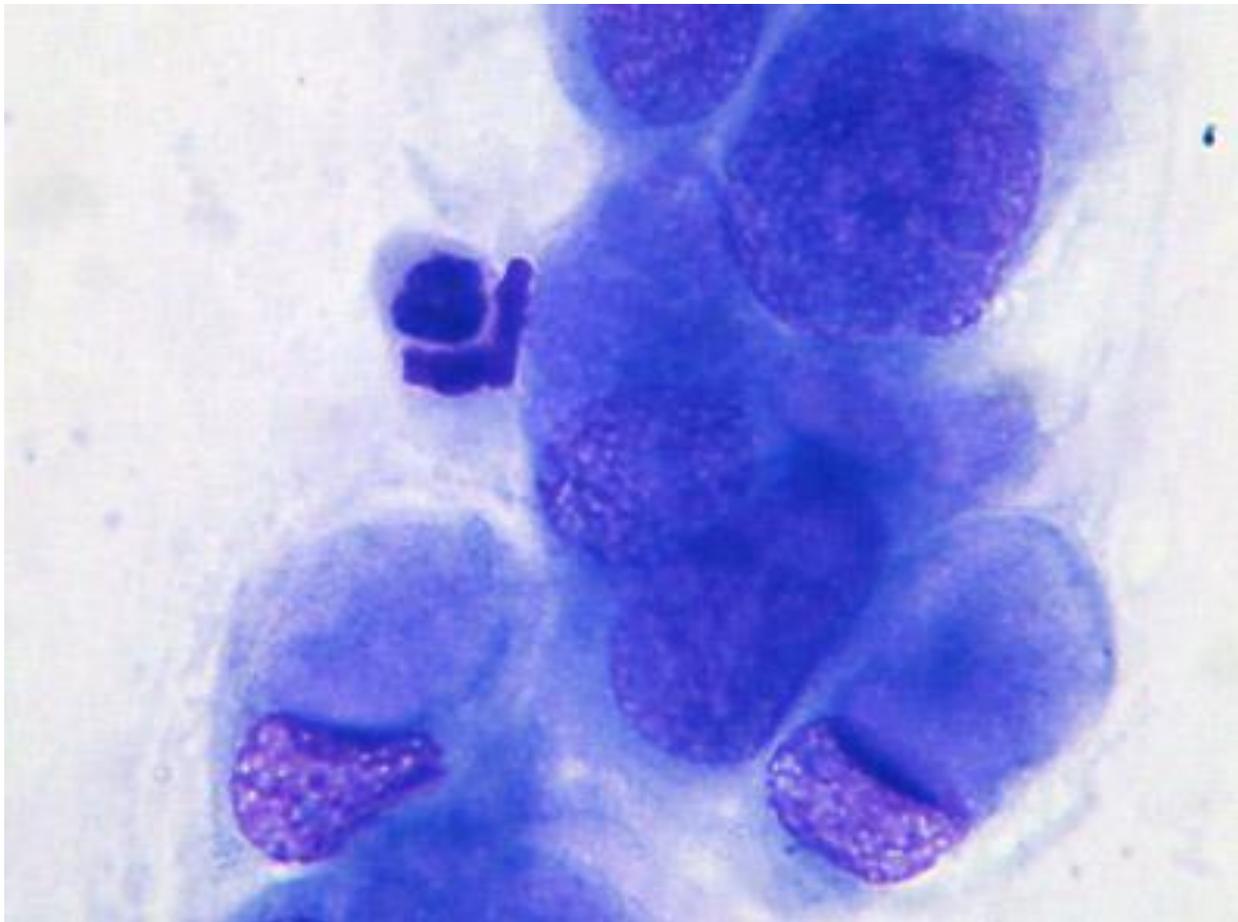
Методы микроскопического изучения микоплазм

- Микоплазмы слабо окрашиваются анилиновыми красителями, их можно окрасить методом Романовского-Гимзы.
- Чаще микоплазмы изучают в нативных препаратах, применяя фазово-контрастную микроскопию. В препаратах видна гетерогенность популяции по размерам, форме, оптической плотности.

Роль микоплазм в патологии человека

- Урогенитальные микоплазмы (*M.hominis*, *M.genetalium*, *U.urealiticum*) часто вызывают хронические заболевания (негонококковый уретрит, спонтанные аборты, бесплодие) у 25-80% людей, ведущих активную половую жизнь.
- *M.incognitos* выделяется при генерализованных процессах.

Возбудитель уретрита



UREAPLASMA urealyticum

- Морфология, ультраструктура и способы размножения сходны с другими микоплазмами.
- Оптимальная температура 36,5-37 °C
- оптимальный pH 6,5-7,0. При незначительном защелачивании среды клетки быстро погибают.
- Уреаплазмы инертны к сахарам
- каталаза-отрицательны.
- Проявляют β -гемолитическую активность по отношению к эритроцитам кролика и морской свинки.
- Секретируют фосфолипазы A1, A2, C. а также протеазы, селективно действующие на молекулы IgA.
- **Культуральные свойства.**
- В жидких питательных средах растут плохо; предпочтителен посев на плотные обогащенные среды. Для роста нуждаются в создании газовой среды, включающей 5% CO₂ и 95% N₂ либо 5% O₂, 10% CO₂ и 85% N₂.

Эпидемиология

- Резервуар возбудителя – больной человек;
- основной путь передачи – воздушно – капельный. Заболевание регистрируют повсеместно.
- К заражению наиболее чувствительны подростки в возрасте 5-15 лет.
- у детей младше 6 мес. инфекции выявляют редко.
- Пик заболеваемости – конец лета и первые осенние месяцы.

Клинические проявления

- У мужчин *Ureaplasma urealyticum* вызывает уретриты и уреаплазменные простатиты.
- У женщин инфекция обычно протекает стёрто; обострения могут провоцироваться присоединившимися инфекциями.
- Проникновение возбудителя в верхние отделы женской половой системы реализуется через сперматозоиды (носители уреаплазм). Колонизация эндометрия часто приводит к самопроизвольным абортам.
- Проникновение уреаплазм в более глубокие отделы мочеполового тракта вызывает я, например острый уретральный синдром.
- Доказана роль уреаплазм в развитии мочекаменной болезни, обусловленной действием бактериальной уреазы.

Роль микоплазм в патологии человека

Микоплазмы являются «мембранными паразитами».

Они прочно прикрепляются к мембране клеток, усваивая через мембрану необходимые питательные вещества, воздействуя при этом своими токсическими продуктами метаболизма на клетку-хозяина.

Эпителиоциты повреждаются, нарушается их жизнедеятельность, но они не погибают.

Микробиологическая диагностика.

- Особенности метаболизма уреоплазм позволяют легко дифференцировать их от прочих микоплазм по способности секретировать уреазу. В настоящее время **метод определения уреазной активности** (образование аммиака из мочевины) — основной способ диагностики уреоплазмозов.
- **Серодиагностика –ИФА**
- **ПЦР**

Лечение и профилактика.

Препараты выбора — тетрациклины, макролиды и фторхинолоны.

Профилактика урогенитальных микоплазмозов аналогична методам предупреждения прочих венерических заболеваний.

Спасибо за внимание!