Лекция №16. Представители родов Vibrio, Campylobacter, Helicobacter.

Род Vibrio.

Семейство Vibrionaceae объединяет подвижные, изогнутые палочковидные бактерии, обладающие полярными жгутиками. Эволюционно происходят из водных бактерий, широко распространены в пресной и морской воде, у беспозвоночных и позвоночных хозяев. Патогенные для человека виды относят к родам *Vibrio, Aeromonas* и *Plesiomonas.*

Для рода Vibrio характерны короткие прямые или изогнутые грамотрицательные палочки, подвижные, не образующие спор и капсул, хорошо растущие на обычных средах. Они ферментируют углеводы с образованием кислоты без газа, чувствительны к вибриостатику О/129. Можно культивировать при температуре от плюс 18 до 37° С, pH 8,6-9,0.

От других родов семейства представители рода Vibrio дифференцируют по биохимическим тестам. Род насчитывает более 25 видов, из них основное значение имеет *Vibrio cholerae*- возбудитель холеры, а также V.parahaemolyticum, V.vulnificus.

Vibrio cholerae.

Морфология. Холерный вибрион имеет один полярный жгутик, часто напоминает запятую (*запятая Коха*). Важный диагностический признак - подвижность (определяют микроскопией по методу висячей или раздавленной капли). Морфологически изменчивы. Хорошо окрашиваются водным фуксином Пффейфера и карболовым фуксином Циля.

Культуральные свойства. Факультативный анаэроб. Холерный вибрион неприхотлив к питательным средам. Хорошо размножается на 1% щелочной (pH 8,6-9,0) пептонной воде, опережая бактерии кишечной группы (среда обогащения), образует нежную голубоватую пленку и муть. Для подавления роста протея и некоторых других микроорганизмов используют пептонную воду с добавлением теллурита калия.

На плотных средах холерный вибрион образует гладкие стекловидные, прозрачные с голубоватым оттенком дисковидные колонии вязкой консистенции. Используют щелочной агар, желчно - солевой агар, щелочной агар с кровью, наилучшей является TCBS - агар (агар с тиосульфатом, цитратом, солями желчных кислот и сахарозой).

Биохимические свойства. Холерный вибрион сбраживает с образованием кислоты без газа многие углеводы (глюкозу, сахарозу, маннозу, маннит, лактозу, левулезу, гликоген, крахмал). По отношению к трем сахарам (*триада Хейберга*) - сахарозе, маннозе и арабинозе вибрионы делят на восемь биохимических групп, холерный вибрион относится к первой группе (разлагает сахарозу и маннозу).

Холерный вибрион разлагает желатин, казеин, свертывает молоко и разлагает белковые препараты до индола и аммиака.

Вид V.cholerae делят на *биотипы, серогруппы* и *серовары.*. Основные биотипы - классический (V.cholerae asiaticae) и Эль - Тор (V.cholerae eltor). Серогруппы выделяют по структуре О- антигенов, в основной О1 группе холерных вибрионов выделяют серовары Огава, Инаба и Хикоджима.

Антигенная структура. У холерных вибрионов выделяют термостабильные О- антигены и термолабильные Н- антигены. По структуре О-антигенов выделено 139 серогрупп, биотипы Эль - Тор и классический объединены в 01 группу (типируются 01 - антисывороткой). Изоляты Эль - Тор отличаются гемолитическими свойствами (вызывают гемолиз эритроцитов барана), способностью агглютинировать куриные эритроциты, резистентности к полимиксину, чувствительности к фагам.

О- антиген 01 группы неоднороден и включает общий А- компонент и два типоспецифических - В и С. Соответственно их наличию серовар Огава имеет сочетание АВ, Инаба - АС, Хикоджима - АВС.

Холерный вибрион может переходить из S- в R- форму, не агглютинироваться О- сывороткой. В связи с антигенной структурой для идентификации V.cholerae используют О- сыворотку, OR- сыворотку (для выявления OR- и R- диссоциантов), типоспецифические сыворотки Инаба (С) и Огава (В). В 90- е годы выявлен новый серовар V.cholerae 0139, не агглютинирующийся вышеуказанными сыворотками, по остальным свойствам мало отличающийся от холерного вибриона 01 группы.

Не типируемые основной 01 сывороткой (т.е. не относящиеся к 01 группе) вибрионы называются неагглютинирующими (НАГ) вибрионами-холероподобными или парахолерными. Они имеют общий с холерным вибрионом Н- антиген, но отличаются по О- антигену.

По Н- антигену выделяют группы А и В, холерные вибрионы входят в группу А. Вирионы группы В (биохимически отличающиеся от холерных) имеют неоднородную структуру О- антигена и подразделяются на шесть серологических подгрупп.

Факторы патогенности холерного вибриона.

1. *Подвижность* (жгутики) и *хемотаксис*.

2. *Ферменты* способствуют адгезии и колонизации, взаимодействию с эпителиальными клетками- муциназа (разжижает слизь), нейтаминидаза (взаимодействие с микроворсинками, создание посадочной площадки), лецитиназа и другие.

3. *Эндотоксин* - термостабильный липополисахарид, схожий по структуре и свойствам с другими эндотоксинами грамотрицательных бактерий.

4. Экзотоксин - *холероген* - главный фактор патогенности, термолабильный белок. Синтез холерогена - важнейшее, генетически детерминированное свойство холерного вибриона. Молекула холерогена состоит из двух фрагментов А и В. Собственно токсическую функцию выполняет пептид A_1 фрагмента А. Молекула холерогена распознает рецептор энтероцита, проникает в мембрану клетки, активирует аденилатциклазную систему, накапливающийся циклический АМФ вызывает гиперсекрецию жидкости, Na^+, HCO_3^-, K^+, Cl^- из энтероцитов. Это приводит к характерной для холеры диарее, обезвоживанию и обессоливанию организма.

5. У многих вибрионов, в т.ч. не относящихся к 01 группе, имеются различные *энтеротоксины*.

6. В патогенезе проявлений холеры имеет значение также фактор, повышающий проницаемость капилляров.

Некоторые особенности эпидемиологии. Холера - кишечная инфекция. Основной источник - человек (больной или вибрионоситель), загрязненная вода. Способ заражения - фекально - оральный. Индивидуальная восприимчивость к холере чрезвычайно вариабельна. Характерно большое количество скрытых (стертых) форм, вибрионосительство. Обнаружение возбудителя в воде напрямую связано с

наличием больных или бактерионосителей. Холерные вибрионы 01 группы могут длительно находиться в водных экосистемах в виде *некультивируемых форм*.

Лабораторная диагностика. Холера относится к группе особо опасных инфекций, культивирование ее возбудителя требует соблюдения особого режима биологической безопасности. Основной метод диагностики - бактериологический, включает выделение и идентификацию возбудителя.

Материал для исследования - испражнения и рвотные массы, секционные материалы от погибших, пробы воды и смывы с объектов окружающей среды, пищевые остатки.

Для посева используют жидкие среды обогащения, щелочной МПА, элективные и дифференциально - диагностические среды (лучше TCBS). В качестве транспортной среды наиболее удобна 1% пептонная вода. Подозрительные стекловидные прозрачные колонии пересевают для получения чистой культуры, которую идентифицируют по морфологическим, культуральным, биохимическим свойствам, подвижности, антигенным свойствам, фаготипируют.

Для ускоренной диагностики применяют иммунолюминесцентный метод, биохимическую идентификацию с набором индикаторных дисков, для обнаружения холерных вибрионов в первичных материалах - РНГА с антительным диагностикумом, для выявления некультивируемых форм - ПЦР, для определения вирулентности и синтеза холерогена - биопробы на кроликах - сосунках, ИФА, ДНК- зонды (выявление фрагмента хромосомы, несущего оперон холерогена).

Специфическая профилактика. Имеются различные вакцины - убитая из сероваров Инаба и Огава, анатоксин холерогена, химическая бивалентная вакцина. Вакцины применяют только по эпидпоказаниям (низкая иммуногенность). Может проводиться антибиотикопрофилактика (превентивная терапия) тетрациклином и другими антибиотиками.

V.parahaemolyticus (парагемолитический вибрион) является галофилом, встречается в морской воде (Японского, Черного, Каспийского и других южных морей). При употреблении морских продуктов, не подвергнутых достаточной термической обработке, этот возбудитель вызывает у людей пищевые токсикоинфекции и дизентерия - подобные заболевания. Вызывает гемолиз на кровяном агаре с повышенной концентрацией хлористого натрия (на 7% NaCl - штаммы с энтеропатогенными свойствами).

V.vulnificus - наиболее патогенный вид для человека из нехолерных вибрионов. Выявляют в морской воде и ее обитателях. Вызывает раневые инфекции, септицемии и другие заболевания. Ферментирует сахарозу и лактозу, на TCBS - агаре образует желтые колонии.

Представители родов Campylobacter и Helicobacter.

Грамотрицательные микроаэрофилы этих двух родов - мелкие, подвижные, не образующие спор, изогнутые (S- образные или похожие на крыло чайки) палочковидные бактерии. Виды, составляющие род Helicobacter, в том числе H.pylori - возбудитель язвенной болезни человека, выделены из рода Campylobacter.

Род Campylobacter

Этот род включает 13 видов спиральных бактерий, имеющих один и более завитков. Кампилобактеры - подвижные, обладающие полярными жгутиками (или жгутиком) и винтообразным движением, микроорганизмы. Они не ферментируют и не окисляют углеводы, капрофилы и микроаэрофилы , т.е. требуют повышенной концентрации CO_2 и пониженной - O_2.

Род включает виды, патогенные для человека и теплокровных животных. Заболевания, ими вызываемые - кампилобактериозы - острые кишечные заболевания, протекающие с поражением желудочно - кишечного тракта. Кампилобактеры часто выделяют из кишечника, ротовой полости и органов мочеполовой системы теплокровных.

Выделяют группу C.jejuni (включает этот вид, а также C.coli, C.lari) или термофильных кампилобактерий. Они отличаются высоким температурным оптимумом роста (+42^{0}C).

Среди мезофильных кампилобактерий с оптимумом роста при +37^{0}C существенную роль в патологии человека имеет C.fetus (вызывает артриты, менингиты, васкулиты, аборты), а также имеется ряд условно - патогенных видов (C.concisus и C.sputorum - в ротовой полости, C.fennelliae, C.cinaedi и C.hyointestinalis - в толстом кишечнике).

Культуральные свойства. Для кампилобактеров нужны специальные газовые смеси для создания микроаэрофильных условий, pH - 7,0-7,2, мезофильные условия (+42^{0}C - для термофилов, +37^{0}C - для остальных). Используют специальные питательные среды (мясные, печеночные, кровяные) с добавлением селективных антибиотиков. Для получения более чистых проб для посевов (чаще исследуют копрофильтраты!) можно использовать фильтрацию через мембранные фильтры с диаметром пор 0,65 мкм. На плотных средах образуют два типа колоний - “расползающиеся” с неровными краями или блестящие выпуклые с ровными краями, колонии мелкие.

Биохимические свойства. Инертны к углеводам, редуцируют нитраты, оксидаза - положительны, энергию получают за счет аминокислот и трикарбоновых кислот. Дифференциация видов по биохимическим свойствам основана на *гидролизе гиппурата* (C.jejuni и C.coli), чувствительности к *налидиксовой кислоте* (C.jejuni и C.lari), образовании сероводорода и др.

Антигенная структура. Кампилобактеры имеют О- , Н- и К- антигены. Основное значение для серотипирования имеют термостабильные О-антигены.

Эпидемиологические особенности. Кампилобактеры распространены у различных видов млекопитающих и птиц. Основной путь передачи - пищевой. Характерна преимущественно летняя сезонность.

Основные патогенетические факторы. Кампилобактеры характеризуются высокой адгезивной и инвазивной активностью, быстрой колонизацией верхних отделов тонкого кишечника. Важнейшими факторами адгезии являются жгутики и специфические поверхностные адгезины. У этих бактерий имеется эндотоксин, термолабильный энтеротоксин.

Клинические проявления - энтероколит.

Лабораторная диагностика. Микроскопический метод - окраска 1% водным раствором основного фуксина 10- 20 секунд - выявляют S-образные короткие цепочки, “крылья чайки”. Основной метод - бактериологический - посев испражнений. Культуры идентифицируют по совокупности признаков.

Helicobacter pylori.

Язвенная болезнь - заболевание, которое характеризуется наличием язвенного дефекта в слизистой желудка или двенадцатиперсной кишке. Открытие H.pylori обусловило переворот в представлениях об этиологии, патогенезе, лечении и профилактике язвенной болезни. Язвенная болезнь практически в 100% ассоциирована с хеликобактером пилори. Существенную роль имеют также стрессовые факторы и психологические особенности больных, а также генетические факторы в развитии болезни.

Морфологические и культуральные свойства - аналогичны Campylobacter. Предпочитает шоколадный агар.

Биохимические свойства. Имеет уреазу, оксидаза- и каталаза- положителен.

Антигенные свойства. Имеет О- и Н- антигены.

Патогенез поражений. Хеликобактеры проникают через слой слизи (чаще в антральной части желудка и двенадцатиперсной кишке), прикрепляются к эпителиальным клеткам, проникают в крипты и железы слизистой оболочки. Антигены бактерий (в первую очередь ЛПС) стимулируют миграцию нейтрофилов и вызывают острое воспаление. Хеликобактеры локализуются в области межклеточных ходов, что обусловлено хемотаксисом на мочевину и гемин (разрушение гемоглобина эритроцитов в микроциркуляторном русле). Под действием уреазы хеликобактеров мочевина расщепляется до аммиака, с действием которого связано повреждение слизистой оболочки желудка и двенадцатиперсной кишки. Многие ферменты (муциназа, фосфолипаза и др.) также могут стимулировать нарушения целостности слизистых.

К факторами патогенности H.pylori в первую очередь относят факторы колонизации (адгезию, подвижность), факторы персистенции и факторы, вызывающие заболевание. Ключевые факторы в тропизме и патогенности H.pylori включают механизмы адгезии и секреции бактериальных токсинов. Представлены доказательства ведущей роли Lewis B антигена как рецептора для адгезии. Кроме них имеют значение муцины желудка и сульфатиды слизистой желудка. Выявлен белок Bab A возбудителя (адгезин), который позволяет микроорганизму связываться с групповым антигеном крови Lewis B, присутствующим на поверхности клеток эпителия желудка. Другими факторами патогенности являются cag A (цитотоксин- ассоциированный ген) и vac A (вакуолизирующий цитотоксин). Штаммы, экспрессирующие эти маркеры вирулентности, относятся к штаммам первого типа, которые ассоциированы с повышенным ульцерогенным и воспалительным потенциалом, в отличии от штаммов второго типа, не имеющих этих факторов.

Присутствие всех трех факторов (Bab A, cag A, vacA) является существенным для проявления патогенных свойств H.pylori (триплет - позитивные штаммы). Повреждающее действие на слизистую может быть связано как с прямым действием бактериальных токсинов, так и с опосредованным влиянием через иммунную систему. Длительная персистенция возбудителя связана с рядом механизмов, позволяющих преодолевать защитные барьеры слизистой, и способностью формирования кокковых, не обладающих патогенным потенциалом, форм.

H.pylori не всегда приводит к развитию язвенной болезни, однако при язвенной болезни этот возбудитель выявляют постоянно. Факторы, определяющие ульцерогенность H.pylori, усиленно изучаются.

Лабораторная диагностика должна быть комплексной, основанной на нескольких тестах. Методы выявления могут быть инвазивными (связанными с необходимостью взятия биоптата слизистой) и неинвазивными (косвенными).

Основные методы выявления H.pylori в биоптатах слизистой.

1.Микроскопические методы (окраска гематоксилином - эозином, акридиновым оранжевым, по Граму, водным фуксином, инпрегнация серебром; фазово - контрастная микроскопия с определением подвижности).

2.Определение уреазной активности.

3.Выделение и идентификация возбудителя на плотных средах (чаще кровяных). Посевы осуществляют на кровяной агар, кровяной агар с амфотеррицином, эритрит - агар с амфотеррицином. Культивируют 5-7 суток при 37° С в микроаэрофильных, аэробных и анаэробных условиях. Принадлежность определяют по морфологии микроорганизмов и их колоний, винтообразной подвижности, росту в микроаэрофильных условиях и отсутствию роста в аэробных и анаэробных условиях и при температурах +25 и +42° С, по наличию оксидазной, каталазной и уреазной активности.

4.Выявление антигенов возбудителя в ИФА.

5.ПЦР- диагностика - наиболее чувствительный и специфичный тест.

Среди неинвазивных методов - “дыхательный тест”, ИФА для выявления IgG и IgA - антител.

Лечение комплексное, с применением методов санации (эррадиации возбудителя). Применяют Де- НОЛ (коллоидный субцитрат висмута), ампициллин, трихопол (метронидазол) и др.