Лекция N 20. Хламидии, уреаплазмы, микоплазмы.

Род Chlamydia и род Chlamydophila.

Представители семейства Chlamydiaceae (хламидии) являются патогенными облигатными внутриклеточными бактериями, паразитирующими в чувствительных клетках теплокровных (млекопитающих, птиц, человека и др.).

Они близки по структуре и химическому составу к классическим бактериям. Для них характерно сохранение морфологической сущности на протяжении всего жизненного цикла, деление вегетативных форм, наличие клеточной стенки, содержание ДНК и РНК, энзиматическая активность, чувствительность к антибиотикам широкого спектра, наличие общего родоспецифического антигена.

В то же время хламидии по размерам меньше классических бактерий, имеют небольшой геном, являются облигатными внутриклеточными паразитами с уникальным циклом развития. Они не способны синтезировать высокоэнергетические соединения и обеспечивать собственные энергетические потребности (*энергозависимые паразиты),* что и определяет их облигатный паразитизм.

С учетом своих особенностей хламидии занимают самостоятельное (особое) положение среди других микроорганизмов - прокариот. Для человека имеют значение преимущественно представители двух родов - Chlamydia и Chlamydophila. Наибольшее значение имеют три вида.

Chlamydia trachomatis , различные серотипы которого вызывают *трахому, венерическую лимфогранулему* и наиболее распространенные *урогенитальные хламидиозы.*

Chlamydophila psittaci вызывает *орнитоз* и *зоонозные хламидиозы.*

Chlamydophila pneumoniae вызывает антропонозные пневмонии, ОРЗ, с этим возбудителем связывают развитие некоторых форм бронхиальной астмы, атеросклероза.

Морфологические особенности.

Клеточный цикл развития хламидий имеет две основных формы - *элементарные тельца* (ЭТ) - инфекционная форма и *ретикулярные тельца* (РТ) - вегетативная форма. Сферические ЭТ значительно меньше размерами (менее 300 нм в диаметре), имеют более жестную электронно- плотную структуру, метаболически мало активны, адаптированы к кратковременному внеклеточному существованию.

Цикл развития хламидий осущесвляется в цитоплазматическом включении - *фагосоме* (вакуоле), куда ЭТ попадают путем стимулирования эндоцитоза. В процессе адсорбции и эндоцитоза участвуют термолабильные эффекторные белковые поверхностные антигены хламидий. ЭТ подавляют фагосомо - лизосомальное слияние и преобразуются при участии главного поверхностного протеина в РТ, которые обладают активным метаболизмом, более крупными размерами и активным бинарным делением. Цикл размножения заканчивается обратным переходом РТ в ЭТ, разрывом мембран включения и ограничивающих мембран клетки хозяина, выходом ЭТ из клеток, далее ЭТ инфицируют новые клетки. *Тельца включений* выявляются в клетках при помощи световой и иммунолюминесцентной микроскопии.

Кроме того, хламидии способны образовывать L - формы, персистентные формы.

Культуральные свойства.

Хламидии не растут на питательных средах самого сложного состава (это сближает их по свойствам с риккетсиями и особенно - с вирусами), для их культивирования могут быть использованы лабораторные животные и куриные эмбрионы (биопроба) и особенно чувствительные линии клеток животных - чаще клетки McCoy (чаще с обработкой цитостатиками для повышения чувствительности), которые считались “золотым стандартом” диагностики.

Биохимические свойства.

Способны самостоятельно синтезировать нуклеиновые кислоты, некоторые белки и липиды. Являются энергетически зависимыми от хозяина эндопаразитами. Chlamydia trachomatis обладает гликоген - синтетазной системой (гликоген содержится и выявляется при определенных методах окраски во включениях), синтезирует предшественники фолиевой кислоты и соответственно биохимической активности чувствителен к сульфаниламидам.

Антигенная структура.

1. Выделяют *поверхностный родоспецифический антиген* (ЛПС), локализующийся на наружной мембране клеточной стенки. ЛПС имееи две антигенные детерминанты, одна из них специфична для всего рода, другая перекрестно реагирует с некоторыми другими грамотрицательными бактериями (сальмонеллы серовара minnesota), термостабилен.

2. МОМР - *главный белок наружной мембраны* несет функцию структурного белка и *порина*. Включает термолабильные белковые детерминанты , обладающие видо - , типо - и сероварной специфичностью.

Детерминанты патогенности.

1. Эндотоксин (липополисахарид), подобный эндотоксинам грамотрицательных бактерий.

2. Экзотоксины - термолабильные субстанции.

3. Антигены клеточной поверхности, подавляющие защитные реакции.

Факторы патогенности хламидий препятствуют фагосомо - лизосомальному слиянию в фагоцитах.

Краткая характеристика распространения.

Урогенитальные хламидиозы - наиболее распространенные формы хламидиозов. В крупных странах (США, Россия) ежегодно регистрируют несколько миллионов случаев, в мире - от 50 до 90 млн. случаев. Скудность начальных проявлений и тяжелые последствия урогенитальных хламидиозов, особенно у женщин (нарушения репродуктиной сферы, инфекционные осложнения), предъявляют особые требования к своевременной лабораторной диагностике. Хламидии сероваров D - K Chlamidia trachomatis, вызывающие урогенитальные хламидиозы, передаются от человека к человеку половым путем. Бессимптомное носительство наблюдается не менее чем у 5 % мужчин и 10% женщин. Отдельные серотипы этого возбудителя вызывают такие распространенные в прошлом заболевания как *трахома* (сопровождается

поражениями конъюнктивы и прилегающих тканей глаза, часто приводит к катарактам и слепоте) и *венерическая лимфогранулема* (регистрируют преимущественно в слаборазвитых странах Азии, Африки и Латинской Америки с теплым климатом).

Орнитоз - хламидийная инфекция, вызываемая C.psittaci. Человек заражается от птиц - основных хозяев этого возбудителя воздушно - пылевым и воздушно - капельным путем. В условиях города основную опасность представляют голуби (от 20% до 100% инфицировано этим возбудителем, чаще с ними контактируют дети. В домашних условиях источником могут быть канарейки и особенно попугаи (вызывают наиболее тяжелую форму - пситтакоз). Орнитоз часто протекает как тяжелая интерстициальная пневмония. Кроме этого, серотипы этого возбудителя вызывают зоонозные хламидиозы (например, так называемый вирусный аборт овец, хламидиозы крупного рогатого скота и др.), при контакте с больными животными могут развиваться различные формы хламидиозов у людей. Клинико - эпидемиологические особенности зоонозных хламидиозов у людей изучены недостаточно.

Бронхопневмонии , вызываемые C.pneumoniae. Это антропонозные инфекции, передаваемые от человека к человеку, большая часть случаев протекает субклинически. Возникают поражения верхних дыхательных путнй с последующим развитием бронхопневмонии. Это распространенные инфекции (антитела к C.pneumoniae выявляют почти у половины взрослого населения), однако диагностируются до настоящего времени плохо. С этим возбудителем связывают развитие отдельных форм бронхиальной астмы и атеросклероза.

С учетом многообразия клинических проявлений и необходимостью дифференциации различных клинических форм хламидиозов (прежде всего генитальных и экстрагенитальных) особое значение приобретает лабораторная диагностика.

Лабораторная диагностика.

Золотой стандарт - *метод культивирования в культурах клеток* применяется очень редко в связи с трудоемкостью и длительностью культивирования, необходимостью работы с инфекционным материалом, этот метод по чувствительности уступает ПЦР, требует быстрой доставки материала для исследования.

Применяемые лабораторные методы можно разделить на две основные группы - *методы выявления антител* и *методы выявления антигенов*.

Методы выявления антител наиболее эффективны при генерализованных формах хламидиозов, сопровождающихся выработкой антител в высоких титрах (орнитоз), и мало эффективны при локальных (особенно хронических) формах (урогенитальные хламидиозы). Большинство методов выявляет антитела к группоспецифическому липополисахариду хламидий, что не позволяет определить вид хламидий. Среди используемых методов:

- *РСК* - достаточно специфичный, но мало чувствительный метод;

- *РНГА* - более эффективный метод для диагностики текущего инфекционного заболевания;

- *ИФА* - наиболее чувствительный метод серологической диагностики. Некоторые варианты тест - систем ИФА позволяют дифференцировать C.pneumoniae от хламидий других видов;

- *РНИФ* - обладает наибольшей степенью видоспецифичности.

Методы выявления возбудителя, его ДНК и антигенов.

1. *Цитологические методы* с окраской мазков по Романовскому - Гимзе и другими методами мало чувствительны и специфичны, имеют преимущественно историческое значение.

2. *Метод флюоресцирующих антител (МФА)* с моноклональными антителами (МКА) к группоспецифическому липополисахариду хламидий - наиболее распространенный, чувствительный и специфичный метод, позволяет выявлять локализацию возбудителя (урогенитальные мазки), морфологию (характер гранул, преобладание РТ или ЭТ). Метод требует высокой квалификации микроскописта и качества мазка - отпечатка (достаточное количество клеток с учетом внутриклеточного расположения возбудителя).

3. *ИФА для выявления антигена* применяется относительно реже, требует большого количества материала (соскоб), связана с получением суспензии и опасностью инфицирования персонала.

4. *ПЦР для выявления ДНК хламидий* - наиболее чувствительный метод. Однако и при нем возможны ложноположительные (при недостаточной чистоте работы - при контаминации) и ложноотрицательные (наличие в пробах материала ингибиторов Tag - полимеразы) результаты.

Недостатки чувствительных методов выявления антигенов возбудителя - возможность получения положительных результатов даже через 1 - 1,5 месяца после излечения. Нужна полная замена эпителия слизистой, содержащего поверхностные антигены разрушенных хламидий, для получения отрицательных результатов. Особенно это относится к ИФА, ПЦР, для МФА - в меньшей степени (этот метод позволяет оценить морфологию включений хламидий).

Лечение и профилактика.

Хламидии - внутриклеточные паразиты. Применяют антибактериальные препараты, проникающие в клетки, чаще доксициклин или сумамед (азитромицин). Эффективному лечению часто препятствует одновременное наличие у больных гонококков и трихомонад (в трихомонадах хламидии могут находиться внутриклеточно). Эффективность современных методов лечения урогенитальных хламидиозов не превышает в идеале 98 - 99%, т.е. часть пациентов эффективно освободить от хламидий не удается, даже после нескольких циклов лечения. У этих больных часто развиваются дисбактериозы, присоединяется кандидоз, снижается резистентность к различным инфекционным агентам.

Эффективных методов специфической профилактики нет.

Род Mycoplasma и род Ureaplasma

Микоплазмы - самые мелкие прокариотические микроорганизмы, *не имеющие клеточной стенки* (это придает им сходство с L - формами бактерий) и способные *к паразитированию на мембранах эукариотических клеток*. Способность *персистировать* на мембранах клеток связана с наличием сходства структуры и состава цитоплазматической мембраны микоплазм с мембранами клеток эукариот и использовании микоплазмами их компонентов (прежде всего холестерина и фосфолипидов) для построения собственных структур. Микоплазмы имеют трехслойную цитоплазматическую мембрану, обеспечивающую целостность микробных клеток и частично замещающую в функциональном отношении отсутствующую клеточную стенку.

Современная систематика относит представителей семейства Mycoplasmatacea к классу Mollicutes (молликут - “мягкокожих”), объединяющему *микоплазмы, уреаплазмы, ахолеплазмы* (первые три рода молликут встречаются у человека, среди них встречаются патогенные и сапрофитические виды), *спироплазмы* и *анаэроплазмы.*

Основные характеристики молликут - отсутствие истинной клеточной стенки, мелкая кокковидная форма, паразитизм на мембранах эукариотических клеток, рост на плотных средах в виде мелких врастающих в агар колоний с приподнятым центром (“яичница - глазунья”), абсолютная резистентность к пенициллинам и другим действующим на синтез клеточной стенки антибиотикам. Характеризуются малым размером генома, низким содержанием Г+Ц в ДНК. Имеют от 104 до 113 нуклеотидов в 5S рРНК.

Представители рода микоплазм - паразиты и возбудители заболеваний (микоплазмозов) широкого круга млекопитающих, птиц, человека. Представители некоторых видов встречаются на растениях и в насекомых. Известно около 100 видов микоплазм, число новых видов продолжает увеличиваться. 12 видов встречаются у человека, из них наибольшее значение имеют M.pneumoniae (вызывает в основном пневмонии и ОРЗ), M.hominis, M.genitalum, M.fermentans (при вызываемых ими инфекциях преобладают урогенитальные поражения). В составе *рода Ureaplasma* выделено пять видов. Штаммы, выделенные от людей, составляют вид U.urealyticum, от КРС - U.diversum, от птиц - U.gallorale, от кошек - U.cati и U.felinum.

Морфология

Наиболее типичны мелкие кокковидные формы, выражен полиморфизм.

Культуральные и биохимические свойства

Микоплазмы прихотливы к условиям культивирования. В составе сред необходимы холестерин и стерины, нативные сыворотки, витамины, соли. Основным источником энергии являются углеводы (особенно глюкоза) или аминокислоты (аргинин). Для усиления восстановительных свойств сред добавляют L- цистеин.

Используют различные варианты жидких, полужидких и плотных питательных сред, включающих гидролизаты мяса, казеина, ферментативный пептон, аутолизат пекарских дрожжей, сыворотку крови лошадей (больше всего холестерина), *основной субстрат* - глюкозу (для глюкозоферментирующих микоплазм), аргинин (для аргинин- утилизирующих микоплазм), мочевину (для уреаплазм), селективные антибиотики (пенициллин и его синтетические аналоги, амфотеррицин, нистатин или низорал, для уреаплазм - линкомицин), индикатор pH (бромтимоловый синий или феноловый красный).

Оптимум температуры для культивирования от + 35 до +37С. Оптимум pH для уреаплазм и аргинин- утилизирующих микоплазм - 6,0 - 6,5. При росте уреаплазм, обладающих ферментом *уреазой*, происходит расщепление мочевины до аммиака с повышением pH (сдвиг в щелочную сторону) и с изменением цвета среды с бромтимоловым синим из желто - лимонного до зеленого без образования значительного осадка и без помутнения среды. Аналогично происходит изменение цвета сред при росте аргинин- утилизующих микоплазм на средах с добавлением аргинина.

Оптимум pH для глюкозоверментирующих микоплазм (M.genitalium, M.fermentans, M.pneumoniae) - около 8,0. Эти микоплазмы ферментируют глюкозу до углекислого газа со сдвигом pH в кислую сторону и изменением цвета среды с зеленого на желто - лимонный.

Колонии уреаплазм (ранее называли Т- микоплазмами от “tiny -маленький”) значительно меньше колоний классических микоплазм, на средах с добавлением сульфата марганца их колонии окрашиваются в золотисто - коричневый цвет, в отличии от микоплазм уреаплазмы мало чувствительны к небольшим дозам линкомицина (15 мкг/ мл).

Антигенная структура

Микоплазмы характеризуются выраженной гетерогенностью и изменчивостью антигенной структуры (антигенный полиморфизм). Известно 16 серотипов U.urealyticum, разделенных на серогруппы А и В. Степень гомологии серотипов существенно отличается. Часто выделяют от больных смешанные культуры различных серотипов. Выделяют биовары уреаплазм, отличающиеся по вирулентности и строению гена основного фермента - уреазы. Аналогичная динамичность и гетерогенность антигенной структуры и наличие различных сероваров характерна и для различных видов классических микоплазм. По биохимическим и в определенной мере антигенным свойствам среди микоплазм имеются виды - двойники (например, M.pneumoniae и M.genitalium). Среди антигенов выделяют белки - адгезины, фосфо - и гликолипиды, полисахаридные компоненты.

Факторы патогенности

1. Адгезины (обеспечивают взаимодействие с клетками хозяина).

2. Эндотоксины (не тождественны ЛПС грамотрицательных бактерий).

3. Гемолизины (особенно - у M.pneumoniae).

4. Экзотоксины (плохо изучены и известны у немногих видов).

5. Ферменты - фосфолипаза А, аминопептидазы, протеазы, нейраминидаза.

Патогенез.

Микоплазмы - мембранные паразиты и способны адсорбироваться на различных эукариотических клетках. Этому способствует подвижность патогенных микоплазм, связанная с хемотаксисом и наличием микроворсинок. Микоплазмы способны тесно связываться с мембранами эукариотической клетки, вступать в межмембранное взаимодействие, обмениваться мембранными компонентами (в том числе использовать холестерин и стенолы для построения собственных клеток), оказывать разнообразное влияние на клетки. Коротко остановимся на *основных эффектах действия микоплазм на различные клетки*.

1. Взаимодействие с фагоцитирующими клетками вызывает цитопатический или цитотоксический эффект и гибель фагоцитов или приводит к длительной персистенции микоплазм в фагосомах фагоцитов.

2. Воздействие микоплазм на макрофаги приводит к нарушению их функций.

3. Персистенция микоплазм на мембранах лимфоидных клеток оказывает существенное влияние на их функции, в том числе непосредственное деструктивное воздействие на иммунокомпетентные клетки (M.fermentans оказывает СПИДо - подобное действие на иммунную систему).

4. Микоплазмы действуют на эритропоэз, т.е. на гомеостаз организма.

5. Обмен антигенными компонентами мембран с клетками хозяина обеспечивает антигенную мимикрию и развитие аутоиммунных реакций.

6. Отсутствие клеточной стенки и частоя локализация микоплазм в инвагинатах мембран клеток объясняет их слабую иммуногенность и защиту от действия антител. Этому способствует и высокая антигенная изменчивость молликут.

7. Микоплазмы способны воздействовать на хромосомный аппарат клеток хозяина (на соматические и половые клетки), вызывая хромосомные абберации.

8. Ряд продуктов метаболизма оказывает токсическое воздействие на инфицированные клетки. Так, глюкозоферментирующие микоплазмы резко снижают pH и оказывают этим деструктивное действие на эпителиальные клетки.

Частота распространения отдельных видов микоплазм.

Среди урогенитальных молликут на первом месте уреаплазмы, на втором - M.hominis, они по частоте встречаемости уступают только хламидиям. Большинство микоплазм - возбудители оппортунистических инфекций, наиболее часто их выявляют у категорий риска (больные с воспалительными процессами гениталий, часто меняющие сексуальных партнеров и др.), у беременных. Наибольший патогенный потенциал признают за M.pneumoniae, M.fermentans, U.urealyticum, M.hominis. M.pneumoniae - один из распространенных возбудителей, вызывающих пневмонии и другие инфекционные заболевания дыхательных путей человека. Большинство выделяемых от животных микоплазм не имеет медицинского значения.

Лабораторная диагностика

Наиболее оптимальна *культуральная (бактериологическая) диагностика* с использованием жидких и плотных питательных сред, особенно в сочетании с антибиотикограммой и определением титра микоплазм (уреаплазм) в нативных образцах. Преимущества этого подхода: быстрота (для уреаплазм 1-2 суток, для микоплазм - до 3 суток), простота (цветной пробирочный тест), достоверность (селективность сред, учет биохимизма возбудителей), возможность определения конценрации (титр 10000 цветообразующих единиц - ЦОЭ имеет диагностическое значение) и чувствительности к различным препаратам на основе антибиотикограммы (повышает эффективность лечения), возможность достоверного контроля эффективности лечения (растут только жизнеспособные микоплазмы).

Наиболее чувствительна *ПЦР - диагностика*. Однако: возможны ложно - положительные и ложно - отрицательные результаты, длительность выявления положительных результатов контроля излеченности, невозможность определения титра микоплазм (не разработаны количественные методики) и чувствительности к препаратам.

Люминесцентная диагностика дает неудовлетворительные результаты чаще, чем при выявлении хламидий. Это связано с малыми линейными размерами возбудителей, серологической гетерогенностью и антигенной изменчивостью, возможностью перекрестных реакций между различными видами, наличием диагностических препаратов только для выявления уреаплазм и M.hominis.

Серологические методы многочисленны, однако коммерческие препараты отсутствуют, существуют проблемы в интерпретации результатов.

Лечение должно быть основано на подборе чувствительных антибиотиков (чаще применяют макролиды, тетрациклины - доксициклин) и бактериологическом контроле эффективности лечения. Имеются устойчивые к тетрациклинам, макролидам и другим антибиотикам штаммы (связано с наличием плазмид устойчивости). У микоплазм имеются специфические вирусы, в т.ч. бактериофаги. В лечебных и диагностических целях они до настоящего времени не используются.

Специфическая профилактика не разработана. Иммунитет нестойкий, серотипоспецифический.