**Лекция №** **21**

**Тема Возбудитель холеры.**

**План:**

Систематика возбудителя.

Морфологические, культуральные и биохимические свойства.

Пути передачи, патогенез, клиника и профилактика холеры.

Методы м/б диагностики холеры. **.**

К семейству Vibrionaceae относятся несколько родов, из которых род Vibrio включает патогенные и условно-патогенные для человека виды. К патогенным относятся возбудитель холеры - V. cholerae и V. eltor, к условно-патогенным - Aeromonas hydrophilia и Plesiomonas.

## Холерный вибрион

V. cholerae был выделен Р. Кохом в 1882 г., а V. eltor - на карантинной станции Ель-Тор также в Египте. Другие роды данного семейства содержат условно-патогенные виды (V. proteus, вибрион Мечникова, V. plesiomonas, светящийся вибрион), которые могут вызвать гастроэнтериты.

#### Морфологические, культуральные и биохимические свойства.

Слегка изогнутая грамотрицательная полиморфная палочка. Монотрих. Спор и капсул не образует. Вибрионы относятся к хемоорганотрофам с окислительным и бродильным типами метаболизма. Ферментируют многие углеводы: глюкозу, мальтозу, сахарозу и другие с образованием кислоты. Разжижают желатин, образуют индол, восстанавливают нитраты в нитриты. Продуцируют такие ферменты как лецитиназа, лизиндекарбоксилаза, орнитиндекарбоксилаза, нейраминидаза. Способность восстанавливать нитраты и образовывать индол лежит в основе положительной нитрозоиндоловой пробы - реакции холера-рот. Вибрионы хорошо растут на простых средах при щелочной реакции рН = 8,5-9,0. На плотных средах образуют небольшие прозрачные круглые колонии, на жидких - пленку с легким помутнением среды. Вибрионы - факультативные анаэробы, образуют цитохромоксидазу.

#### Антигены

Холерные вибрионы имеют два антигена: О-антиген типоспецифический термолабильный и Н-антиген жгутиковый видоспецифический термостабильный. Возбудители холеры имеют 01-антиген. Вибрионы, относящиеся к серогруппам 02, 03, 04 могут вызвать энтериты и гастроэнтериты. 01-антиген состоит из трех компонентов - А, В, С, разные сочетания которых образуют серовары Огава (АВ), Инаба (АС), Гикошима(АВС). Часто выделяются вибрионы, не агглютинирующиеся 01 антисывороткой. Их называют неагглютинирующимися НАГ-вибрионами.

Пути передачи, патогенез, клиника и профилактика холеры.

Холерный вибрион с помощью жгутика и фермента муциназы проникает в слизистую оболочку тонкой кишки и прикрепляется к энтероцитам. Адгезия происходит за счет филаментоподобного вещества, находящегося на клеточной стенке вибриона. Затем начинается колонизация слизистой кишки. При этом вибрионы не проникают в энтероциты, а находятся на их поверхности. Основным фактором патогенности вибриона является секреция белковых токсинов. Это прежде всего холероген, который относится к функциональным блокаторам. Он, как и многие другие экзотоксины, состоит из двух субъединиц А и В. Последняя не ядовита. Она обеспечивает прикрепление специфического рецептора мембраны энтероцитов тонкой кишки - моносиалоганглиозида - к клеткам кишечного эпителия, способствующего трансмембранному переносу А-субъединицы в цитоплазму. Субъединица А обеспечивает токсичность, вызывая активацию аденилатциклазы. Это приводит к увеличению количества цАМФ (циклический монофосфат) и соответственно - к нарушению водно-солевого обмена, обусловленного выделением ионов натрия и хлора и обезвоживанию организма - характерного синдрома холеры. При этом организм теряет до 30 л жидкости в сутки. Одновременно блокируется АТФ-аза, что приводит к нарушению внутриклеточного транспорта и потере воды, а также нарушению межклеточных контактов. Холерный вибрион, так же как и другие грамотрицательные бактерии, образует эндотоксин (ЛПС в составе клеточной стенки), который защищает возбудителя от фагоцитоза и обладает другими функциями.

#### Иммунитет

При холере наблюдается гуморальный иммунный ответ, который характеризуется появлением антитоксических (к холерогену) и антибактериальных иммуноглобулинов. При этом существенную роль играют секреторные иммуноглобулины (SIgA), препятствующие адгезии вибриона.

#### Экология и эпидемиология

Единственным источником инфекции в природе является больной человек и бактерионосители. При холере El-Тог отмечается длительное бактерионосительство и многочисленные атипические формы болезни, что способствует распространению возбудителя. Заражение человека происходит через воду или продукты. Возможно заражение контактным путем. Холера является древнейшей инфекцией, которая периодически распространялась на многие страны и континенты, унося миллионы жизней. До сих пор эндемическим очагом холеры считаются бассейны рек Ганга и Брахмапутры в Индии.

## Холера

Холера - острая, карантинная, особливо опасная инфекционная болезнь с фекально - оральным механизмом передачи характеризуется обильным поносом, рвотой, сильной интоксикацией и обезвоживанием организма. Возбудителями заболевания являются два биовары холерного вибриона Vibrio cholerae и Vibrio eMgrJDбидва относятся к роду Vibrio семьи Vibrionaceаe. Кроме этих возбудителей, к роду Vibrio относятся также условно-патогенные вибрионы: V.metschnikovii, V.parahaemolyticus, V.alginolyticus, V.vulnificus, V.fluvialis. При определенных условиях они могут вызвать у человека гастроэнтерит.

Методы м/б диагностики холеры. **.**

Для микробиологического исследования стерильной ложкой берут испражнения, рвотные массы, промывные воды больного в объеме 10-20 мл, переносят их раздельно в стерильные стеклянные банки, закрывают стеклянными или резиновыми пробками и заливают парафином. Наилучшие результаты дает исследование проб, взятых до начала антимикробной терапии. Вторую порцию испражнений и рвотных масс в объеме 1-2 мл засевают у постели больного в 10-50 мл транспортной среды (1% пептонная вода рН 7,8 или рН 9,3). Если стула в момент забора материала нет, вырезают загрязненные фекалиями участки белья. Исследуют также желчь, взятую с помощью дуоденального зондирования. Во время эпидемической вспышки холеры широко практикуют ректальный забор. Для этого стерильный ватный тампон или алюминиевую петлю вводят в прямую кишку на глубину 5-19 см, забирают содержимое и вносят во флакон или пробирку с 1% щелочной лептонной водой. От трупа берут небольшие участки тонкой кишки с верхнего и нижнего отдела, перевязывают с обоих концов лигатурами. Убирают также отрезок прямой кишки длиной 10-15 см. Желчный пузырь вырезают части паренхимы печени. При бактериологическом обследовании людей, которые были в контакте с больными или вибрионосиямы, а также реконвалесцентов перед выпиской из стационара целесообразно заранее дать им слабительное, которое одновременно действовало бы и как желчегонное (напр. 25-30 г сульфата магния). Для исследования отбирают жидкую часть стула, поступивших из верхнего отдела тонкой кишки и имеют содержимое желчного пузыря. По эпидемиологическим показаниям исследуют воду открытых водоемов, водопроводную воду, сточные воды, ил, гидробионтов (рыб, лягушек, устриц, моллюсков, рачков и т.д.), пищевые продукты. Смывы с объектов окружающей среды отбирают с площади 0,25 м2 ватными тампонами, смоченными 1% щелочной лептонной водой, и в ней транспортируют в лабораторию. На каждую банку, флакон, пробирку наклеивают направление, в котором указывают фамилию, инициалы, возраст больного, его домашний и служебный адрес, предварительный диагноз, дату и время взятия проб, подпись врача, направившего материалы. Отобранные пробы необходимо доставить в лабораторию в течение 3-х часов. Если это невозможно, материал сеют в 1% пептонную воду теллурита калия (1:100000) и на чашки со щелочным мясопептонного агаром. При большом расстоянии до лаборатории все пробы помещают в металлические пеналы, или банки, обмостившы ватой или стружками. Затем их упаковывают в деревянный ящик, пломбируют, надписывают "верх, осторожно!" и с большими предосторожностями специальным транспортом с посланцем доставляют в лабораторию. Холера - особо опасное заболевание. Поэтому бактериологическое исследование нужно проводить в режимных лабораториях, в которых работает специально подготовленный персонал. Если вблизи такой лаборатории нет, исследуемый материал направляют в ближайшую обычной бактериологической лаборатории. Тогда прием других анализов прекращают, устанавливают строгий противоэпидемический режим, персоналу запрещают работать натощак. Лаборатория должна работать круглосуточно.

#### Бактериологическое исследование

Лабораторная диагностика холеры имеет исключительно большое значение, поскольку выделение возбудителя дает право установить окончательный диагноз и развернуть профилактические меры для прекращения эпидемического распространения заболевания. Кроме того, она позволяет выявить вибрионосии, оценить контроль за объектами окружающей среды и эффективность дезинфекции. Бактериологическое диагностику проводят поэтапно. Первый этап. Изучаемых материалов изготавливают мазки, фиксируют спиртом или смесью Никифорова, окрашивают по Граму и микроскопируют под иммерсионным объективом. Холерные вибрионы выглядят немного согнутыми палочками красного цвета, расположенными между тяжами слизи в виде своеобразных скоплений, напоминающих "стайке рыбок". На этом этапе с целью ускорения исследования целесообразно использовать реакцию иммунофлюоресценции . Для быстрого и надежного обнаружения холерных вибрионов в различных объектах окружающей среды, особенно тех, которые плохо или совсем не культивируются, используют метод полимеразной "цепной реакции. Одновременно с бактериоскопию проводят посев исследуемого материала в жидкие и на плотные питательные среды. Из жидких сред чаще используют 1% щелочную пептонную воду теллурита калия и среда Монсури, из плотных - щелочной МПА, селективные среды TCBS, Аронсона, Монсури. Посевы делают в 1% пептонную воду, щелочной МПА и на одно из селективных сред (лучше всего TCBS). При доставке материала в транспортной среде из него делают висел в 50 мл 1% лептонной воды рН 9.3 (среда обогащения). tV Среда Аронсона: МПА, к которому добавляют сахарозу и фуксин, обесцвеченный сульфитом натрия. Среда Монсури: на 1 литр дистиллированной воды берут 15 г агар-агара, 1 г желатина, 10 г хлорида натрия, 50 г таурохолаиу натрия, ЗО г карбоната натрия. Среда TCBS (тиосульфат-цитрат-бромтимол сахарозный агар) имеет стандартный состав, выпускается в готовом сухом виде. На 1 л дистиллированной воды добавляют 69 г сухого порошка. Второй этап. Через 5-6 ч инкубации посевов в термостате производят мазок с поверхности жидкой среды, висящую каплю для определения подвижности и проводят ориентировочную реакцию агглютинации на стекле с 01 (или RO, 0139) диагностической сывороткой ("слайд-агглютинация"). Одновременно делают высев с 1% пептонной воды на щелочной МПА или другие селективные среды с целью получения изолированных колоний. При отсутствии видимого роста в первой лептонной воде производят высев из нее в другую пептонную воду (в случае первоначального посева в среду обогащения с рН 9,3 дальнейшее висел над ним проводят через 14-20 ч). Посевы в жидкие и на плотные среды проводят большой бактериологической петлей диаметром 5 мм. По результатам исследования выдают предварительный ответ об обнаружении холерного вибриона. Третий этап. Посев из второй среды обогащения производят на щелочной МПА (или один из элективных плотных сред) через 5-6 ч при рН 7,8 и через 14-20 ч при рН 9,3. Четвертый этап. Через 16-24 ч выращивания посевов на плотных элективных средах проводят макро-и микроскопическое исследование изолированных колоний и пересел на двовуглеводне среду Ресселя (лакгозно-сахарозный агар) или на тривуглеводне среду Клиглера (глюкозо-лактозо-сахарозный агар) с целью выделения чистой культуры и ее идентификации. Колонии холерных вибрионов на щелочной МПА в типичной S-форме имеют размеры 2-3 мм, круглые, гладкие, плоские, голубоватые, прозрачные, гомогенные, с ровными краями, маслянистой консистенции, легко снимаются петлей и емульгуються. При посеве материалов от больных, принимавших антибиотики, и виброносиив, могут вырастать атипичные колонии. На агаре Аронсона колонии холерных вибрионов имеют ярко-красный цвет, в среде TCBS они желтые на зеленом фоне, в среде Монсури колонии без цвета, полупрозрачные, с темным центром. С колониями на щелочной МПА ставят пробу на оксидазу, а с теми колониями, выросшие на элективных средах, эту пробу ставить нецелесообразно. При отборе колоний используют индикаторные бумажки (СИП-1 - набор для идентификации вибрионов). Оксидазопозитивни колонии проверяют в "слайд агглютинации" с холерной сывороткой 01 (R0, 0139) в разведении 1:100 и вариантоспецифичнимы сыворотками Инаба и Огава (1:50) готовят мазки для окраски по Граму и обрабатывают люминесцентной сывороткой. Положительные результаты дают право выдать предварительный ответ об обнаружении холерного вибриона. Пятый этап. Исследуют характер роста на поливуглеводних средах. Холерный вибрион на агаре Ресселя меняет цвет столбика при сохранении первоначального цвета скошенной части без образования газа. Среда Клиглера желтеет полностью без образования газа и сероводорода. Культуры проверяют по морфологическим и аглютинабельнимы свойствами, а в случае необходимости определяют группу по Хейберг. Ставят также развернутую объемную реакцию агглютинации в пробирках по общепринятой методике в соответствии с инструкцией к диагностической сыворотки. При отсутствии реактивов на оксидазу можно использовать пробу "тяжа". На предметное стекло наносят каплю 0,5% водного раствора дезоксихолат натрия или 2,5% раствора моющего средства "Прогресс", добавляют полную петлю агаровой культуры исследуемых вибрионов и тщательно перемешивают. При положительной реакции суспензия немедленно теряет мутность, становится слизистой и вязкой - тянется за петлей в виде тяжа, что характерно для вибрионов. В последнее время разработаны тесты для дифференциации классического варианта холерного вибриона от биовары эльтор. Чувствительность выделенных культур холерных вибрионов к антибиотикам и химиотерапевтических препаратов определяют с помощью метода диффузии в агар с использованием стандартных дисков или методом серийных разведений. Шестой этап. Окончательно учитывают результат идентификации чистых культур и выдают окончательный ответ о выделении холерного вибриона серогруппы: ОИ, RO (Инаба, Огава, Гикошима) или 0139. Если выделенные вибрионы по большинству признаков относятся к холерных, но аглютинуються сыворотками, выдают ответ о выделении холерных вибрионов не ОИ группы (так называемых НАГ-вибрионов). Обязательно отмечают гемолитическую активность, чувствительность к антибиотикам и лизис культуры соответствующим бактериофагом.

#### Методы ускоренной диагностики

Наилучшим является люминесцентно-серологический метод, он дает возможность через 1,5-2 ч выявить холерных вибрионов в исследуемом материале, а также в среде после подращивания в количестве 106 микробных клеток в 1 мл. Методика изготовления мазков, обработка люминесцентной сывороткой, микроскопия и оценка результатов является общей для выявления всех видов бактерий. Она изложена в инструкции, прилагаемой к сыворотки. С помощью метода иммобилизации вибрионов под влиянием специфической холерной 01 сыворотки можно выявить возбудителя в течение 15-20 мин при концентрации в исследуемом материале не менее чем 105 микр.тил / мл. На предметное стекло наносят 2 капли жидких испражнений, рвотных масс или верхнего слоя (пленки) из среды накопления. Первую каплю накрывают покровным стеклом (контроль), ко второй добавляют каплю холерной 01 сыворотки (1:100), перемешивают и также накрывают покровным стеклом. Надавленные капли исследуют под фазово-контрастным микроскопом или используют темнопольный конденсор. При наличии в пробах холерных вибрионов в первой капли видны характерное движение, во второй - иммобилизация микробных тел и их агглютинация. Для ускоренной диагностики применяют также чувствительную реакцию непрямой гемагглютинации с использованием холерного антительного эритроцитарного диагностикума.

#### Метод массового исследования на вибриононосительство

Метод массового исследования на вибриононосительство проводят во время эпидемических вспышек холеры. Стул одновременно забирают из прямой кишки алюминиевыми петлями от 10 человек, рационально сгруппированы, и вносят их в одну колбу с 200 мл щелочной лептонной воды и 01 холерной агглютинирующие сывороткой, разведенной до половины титра. Инкубацию проводят при 37 ° С в течение 3-4 часов. Холерные вибрионы, размножились, начинают аглютинуватись и в виде хлопьев опадают на дно колбы. При положительном результате материал забирают от каждой из 10 человек и исследуют раздельно. Такой метод дает значительную экономию питательных сред и рабочего времени бактериологов.

#### Серологическое исследование

Серологические исследования имеют лишь вспомогательное значение и сводятся к определению в сыворотке крови и вибрионосиив вибриоцидних антител, агглютинины и антитоксина. От больных нужно брать парные сыворотки с интервалом в 8-10 дней (первую пробу берут на 3-5 день болезни). Наиболее чувствительной является реакция определения вибриоцидинив. Эти антитела определяются с 3-го дня заболевания в титрах 1:100-1:1000 и максимально нарастают к 10-12-го дня. При постановке реакции сначала изотоническим раствором хлорида натрия разводят комплемент 1:20 и разливают его в ряд пробирок по 0,9 мл. Затем в первую пробирку вносят 0,1 мл сыворотки больного, перемешивают и последовательно переносят по 0,1 мл в разведении 10в-10, получая десятикратные разведения в объеме 0,9 мл. В каждую пробирку добавляют по 0,1 мл суспензии культуры холерного вибриона, в которой содержится 1 -2 тыс. микробных клеток. Реакцию сопровождают соответствующими контролями комплемента, сыворотки и культуры. Пробирки выдерживают при 37 ° С в течение 60 мин и делают высев из них на секторы агара в чашках Петри, инкубируют в термостате 18-20 ч и подсчитывают количество выращенных колоний. Титром вибриоцидних антител считают максимальное разведение сыворотки, которое вызывает гибель не менее 50% вибрионов по сравнению с количеством колоний, выросших после посева из пробирки контроля комплемента. Противохолерную и противооспенную агглютинины выявляют с помощью развернутой реакции агглютинации. Исследуемую сыворотку разводят 1% щелочной пептонной водой в объеме 1 мл от 1:10 до 1:640. Антигеном служит 3-часовая бульонная культура холерного вибриона, который выделили в данном очаге. В два ряда пробирок с розтитрованимы парными сыворотками вносят по 1 капле культуры и ставят на 60 мин в термостат при 37 ° С, потом до утра в холодильник, после чего учитывают результаты. Реакцию сопровождают, как обычно, контролями сыворотки и антигена. Результат считают ориентировочно положительным при агглютинации Первую сыворотку в разведении 1:40 и выше. Диагностическое значение имеет не менее чем 4-кратное нарастание титра антител в реакции с другой сывороткой. Более чувствительной и специфичной считают двухкомпонентную реакцию непрямой гемагглютинации с эритроцитарным холерным диагностикумом. Необходимые компоненты реакции и методика ее постановки в макро-и микрообъемах приведены в инструкции диагностикума. Обязательно нужно ставить и эту реакцию методом парных сывороток. Диагностическое значение имеет хотя 4-кратный нарастание титра антител в динамике. Определение антитоксинов в сыворотке крови проводят с помощью непрямой гемагглютинации. Исследуемую сыворотку разводят микроабо макрообьемним способом и добавляют эритроцитарный холерный энтеротоксигенными диагностикум. Диагностическим титром считают разведение сыворотки 1:160. Целесообразно исследовать парные сыворотки.

#### Исследование материалов среды

Чаще исследуют воду открытых водоемов, водопроводную воду, гидробионтов, пищевые продукты, мух, смывы с различных предметов. В исследуемую воду (две пробы по 500 мл) добавляют раствор основного пептона до 1% концентрации, инкубируют 5-8 ч при 37 ° С и исследуют поверхностную пленку так же, как и пленку с пептонной воды после посева кала или рвотных масс. Надежные результаты получают при использовании метода фильтрации через мембранные фильтры № 2 или 3, смывы из которых после фильтрации воды засевают в щелочную пептонную воду и на селективные среды. При этом исследуют большие количества воды (1,5-2,5 л). С смыва из фильтров можно делать мазки для окраски их люминесцентной холерной сывороткой, а также ставить реакцию непрямой гемагглютинации. От гидробионтов после их вскрытия сеют желчный пузырь, желудок и кишечник (после их гомогенизации) в 1% щелочную пептонную воду и на элективные агар. Дафний и рачков растирают в ступке и засевают петлей в 1% пептонную воду. Твердые продукты питания измельчают, растирают в ступке с физиологическим раствором хлорида натрия и засевают в количестве 10 г в 50-100 мл 1% пептонной воды и на агаровые среды. Молоко и молочные продукты, смывы с объектов окружающей среды и мух засевают в 1% пептонную воду и исследуют по обычной схеме. В различных объектах окружающей среды могут находиться и другие представители семейства Vibrionaceae, морфологически подобные вибрионов. Особенно это касается родов Aeromonas, Pseudomonas и Plesiomonas. Отличить их от холерных и холероподобных вибрионов можно, в основном, по биохимическим тестам. Для видовой идентификации холерных вибрионов ведущими тестами является агглютинация культуры 01 холерной сывороткой, лизис холерным фагом СIV или eltor 2.

#### Профилактика и лечение

Основные средства борьбы с холерой - раннее выявление больных и вибрионосителей, а также лиц, контактировавших с ними с последующей их изоляцией. Для вакцинопрофилактики используют несколько видов вакцин: корпускулярная убитая, холероген-анатоксин, живая для перорального применения. В нашей стране массовая вакцинация не проводится. Для поздней профилактики и лечения чаще

**Контрольные вопросы для закрепления:**

Систематика возбудителя.

Морфологические, культуральные и биохимические свойства.

Пути передачи, патогенез, клиника и профилактика холеры.

Методы м/б диагностики холеры. **.**

**Основная литература по микробиологии:**

1. Воробьев А.А. Медицинская и санитарная микробиология. – МИА, 2003.
2. Борисов Л.Б. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология. – МИА, 2007.
3. Жукова М.В., Нестеренко Н.В. Курс лекций по микробиологии. Учебное пособие. - КМФК, 2004.
4. Тестовые задания по микробиологии с основами эпидемиологии и методами исследований для студентов отделения «Лабораторная диагностика» - КМФК, 2003.

**Дополнительные источники по микробиологии:**

1. Воробьев А.А. Атлас по медицинской микробиологии. – МИА, 2007.
2. Камышева К.С. Микробиология, основы эпидемиологии и методы микробиологических исследований. – Феникс, 2010.
3. Камышева К.С. Основы микробиологии, вирусологии и иммунологии. – Феникс, 2009.
4. Мартинчик А.Н. Микробиология, физиология питания, санитария. – Academia, 2010.
5. Поздеев О.К. Медицинская микробиология. – ГЭОТАР-Медиа, 2008.
6. Поляк М.С., Сухаревич В.И., Сухаревич М.Э. Питательные среды для медицинской и санитарной микробиологии. – Элби, 2008.
7. Шлегель Г.Г. История микробиологии. – М.: изд-во УРСС, 2002.
8. Микробиология (Электронный ресурс).URL:

<http://window.edu.ru/window/library>

1. Медицинская библиотека (Электронный ресурс).URL:

<http://www.booksmed.com/biologiya/>