

КАЗАНСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ



Микробиология инфекций, вызываемых представителями спорообразующих анаэробов

Зав. каф. микробиологии имени
академика В.М. Аристовского д.м.н.
ИСАЕВА Гузель Шавхатовна



Таксономия

- Тип: *Bacillota*
 - Семейство: *Clostridiaceae*
 - Род: *Clostridium*
 - Виды: *Cl. perfringens*, *Cl. septicum*, *Cl. novyi*, *Cl. sordellii*, *Cl. sporogenes*, *Cl. fallax*, *Cl. Bifermentans*
и т.д.
-



Внесенные изменения в классификацию

- Вид *Clostridium difficile* был перенесён в новый род *Clostridioides* семейства *Peptostreptococcaceae* и ему присвоено наименование *Clostridioides difficile*. В этот же род был перенесён вид *Clostridium mangenotii*.
- Вид *Clostridium litorale* перемещён в род *Peptoclostridium* семейства *Peptostreptococcaceae* и переименован в *Peptoclostridium litorale*.
- Вид *Clostridium sticklandii* перемещён в род *Acetoanaerobium* семейства *Peptostreptococcaceae* и переименован в *Acetoanaerobium sticklandii*.
- Вид *Clostridium dakarense* перемещён в род *Romboutsia* семейства *Peptostreptococcaceae*.
- Вид *Clostridium histolyticum* был перемещён в род *Hathewayia* семейства *Clostridiaceae*.
- В этот же род были перенесены виды *Clostridium limosum* и *Clostridium proteolyticum* с изменением наименования на *Hathewayia limosa* и *Hathewayia proteolytica*, соответственно.
- Вид *Clostridium ramosum* перемещён в род *Erysipelatoclostridium*, и ему присвоено наименование *Erysipelatoclostridium ramosum*.
- Виды *Eubacterium moniliforme* и *Eubacterium tarantellae* перенесены из рода *Eubacterium* и названы *Clostridium moniliforme* и *Clostridium tarantellae*.



Морфологические свойства

- ***Морфологические свойства***
- Бактерии рода *Clostridium* Гр (+). В мазке представляют собой крупные палочки, размеры 1-3×2-10 мкм, все, кроме *C. perfringens*, имеют перитрихально расположенные жгутики, капсулу образует только *C. Perfringens* (в организме человека); образуют субтерминально расположенные споры.



Культуральные свойства

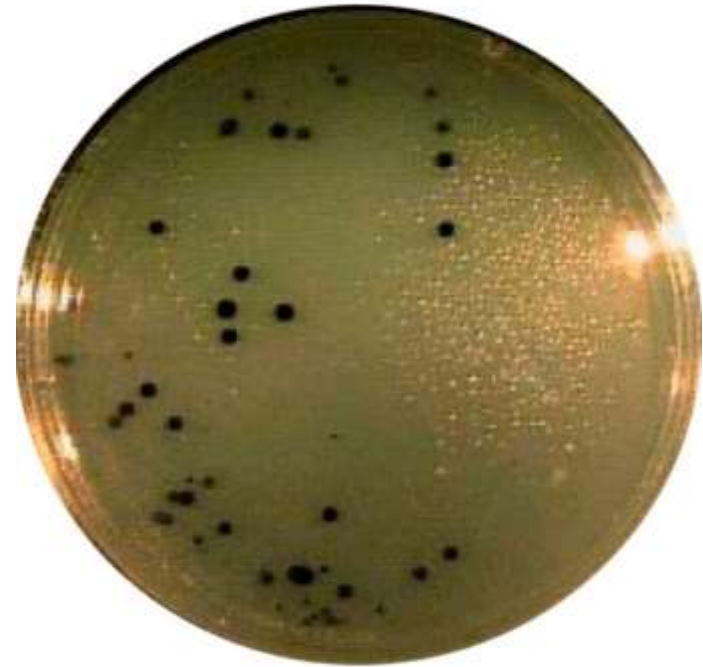
- Среды для выращивания бактерий рода *Clostridium*
- Для культивирования бактерий рода *Clostridium* используются среды с добавлением белков и углеводов (кровяной, сахарный агар, среда Китта-Тароцци, Вильсона-Блера – железосульфитный агар), а также триптозо-сульфит-циклосериновый агар, печеночный бульон и другие.
- Характер роста
- В жидкой питательной среде – рост в виде равномерного помутнения с выделением газа, *C. novyi* дает хлопьевидный осадок в виде «рыхлого» снега. На кровяном агаре могут быть S-(круглые гладкие дискообразные колонии) и R-(бугристые, шероховатые с изрезанными кружевными краями) формы колоний с зоной гемолиза (кроме *C. histolyticum*). В столбике сахарного агара 2 типа колоний – R (диско/чечевицеобразные) и S (пушистые в виде комочков ваты). На среде Вильсон-Блера – черные или зеленоватые колонии за счет восстановления сульфита натрия с образованием сернистого железа.



Культуральные свойства

- Для выделения *C.perfringens* используются дополнительно:
- Колумбийский агар с бараньей кровью . *C.perfringens* образует двойные зоны гемолиза: узкую зону полного гемолиза внутри большой зоны частичного гемолиза за счет действия различные гемолизин
- Среда Виллиса-Хобса (лактозо-желточно-молочный агар) – для выявления лецитиназы и лактазы
- Хромогенный агар – на нем *C.perfringens* образует оранжевые колонии
- Тиогликолевая среда

Рост *S. perfringens* на среде Вильсона-Блера





Требования к культивированию

- Анаэробы, требовательны к питательным средам.
- По степени анаэробии делятся на облигатные анаэробы и аэротолерантные бактерии. *C.perfringens* относится к аэротолерантным.
- Продолжительность культивирования составляет 24-48 часов.



Биохимические свойства

- Сахаролитическая активность наиболее выражена у *C. perfringens* (расщепляет все сахара, кроме маннита и дульцита, до кислоты и газа), *C. sporogenes* ферментирует глюкозу, маннит и галактозу, *C. septicum* – глюкозу и лактозу, *C. novyi* – глюкозу, *C. histolyticum* и *C. sordellii* углеводы не усваивают.
- Протеолитические свойства максимально выражены у *C. histolyticum*: быстро разжижает желатин, пептонизирует молоко через 24 часа (становится прозрачным), в среде Китта-Тароцци через 2-3 часа расплавляет кусочки печени, разжижает свернутую сыворотку; аналогичные протеолитические свойства и у *C. perfringens*: активно свертывает молоко (через 3 часа образует серо-желтый сгусток казеина, который выбрасывается газами под пробку – «штормовая реакция»), разжижает желатин; *C. novyi*, *C. septicum* и др. медленно свертывают молоко, разжижают желатин. Все образуют индол и H_2S .

Факторы патогенности

- α (альфа), β (бета), γ (гамма) – лецитиназа (лейкоцидин);
- δ (дельта) – гемолизин;
- ε (эпсилон) – липаза;
- ζ (зета) – желатиназа;
- η (эта) – тропомиозинаяза;
- θ (тета) – эластаза;
- ι (иота) – фибринолизин;
- κ (каппа) – коллагеназа;
- λ (лямбда) – протеиназа;
- μ (мю) – гиалуронидаза;
- ν (ню) – ДНК-аза.
- Энтеротоксину серотипов А и С
C. perfringens

Эпидемиология газовой гангрены

- Сапронозная инфекция
- Клостридии – представители нормофлоры кишечника животных и человека.
- Резервуар : почва
- Экзогенная инфекция. Путь передачи: контактный – раневой, инъекционный.
- Эндогенная инфекция из собственной микрофлоры при операциях или проникающих ранениях в брюшной полости
- *C.perfringens* серотипы АиС могут вызывать пищевые отравления за счет выработки энтеротоксинов

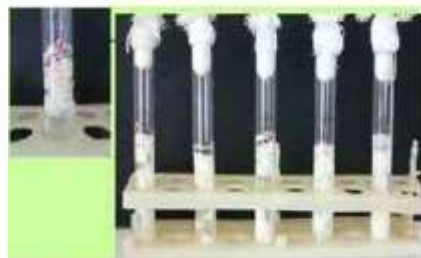
Методы культивирования



Китта-Тароцци
МПБ
Глюкоза
кусочки печени/фарша

Анаэробы

Сахарный МПА
(газообразование)



Молоко (створаживание)



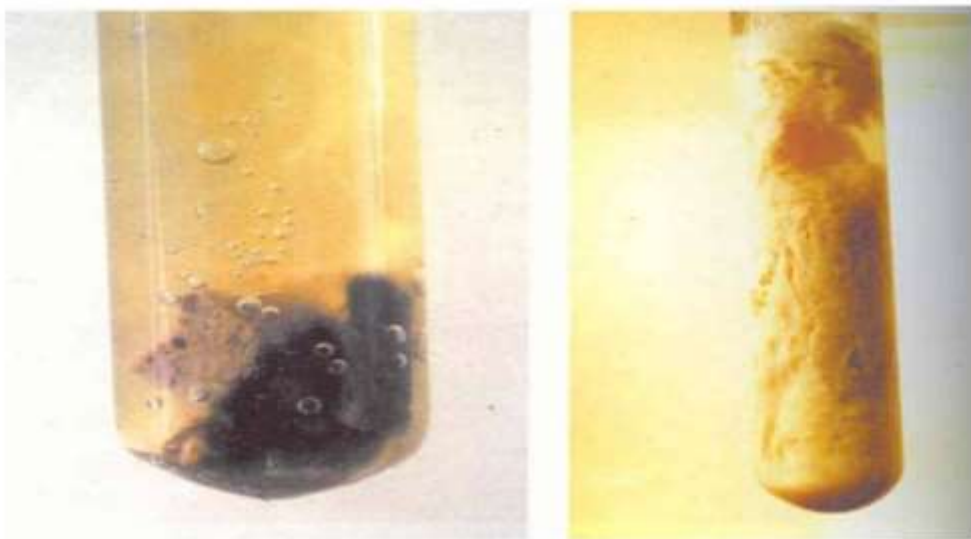
Вильсона-Блера
МПА
Глюкоза
Сульфит натрия
Сульфид железа

КА (колонии с зоной гемолиза)



Экспресс – методы выявления *C.perfringens*

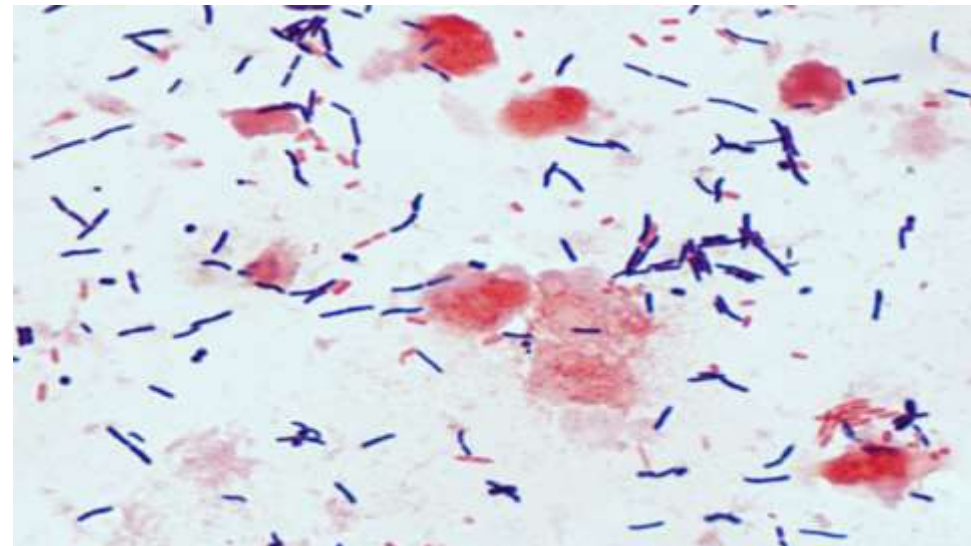
- Рост *Clostridium perfringens* на среде Китта-Тароцци, проявляющийся помутнением среды и образованием пузырьков газа.
- В среду внесены кусочки печени для поглощения кислорода.
- «Штормовая реакция». *Clostridium perfringens* интенсивно сворачивают молоко с образованием крупноячеистого губчатого сгустка уже через 3 ч.




- 1. рост на среде Китта – Тароцци через 1-3 часа с образованием газа и помутнения
- 2. «штормовая реакция» через 1-3 часа после посева
- 3. При росте на среде Вильсона –Блэра через 4-6 часов – почернение среды и разрыв столбика агара

Определение чувствительности к АМП

- *Clostridioides difficile* – возбудитель антибиотикоассоциированной диареи и псевдомембранозного колита. Заболевание развивается в виде дисбактериоза как осложнение при нерациональной антибиотикотерапии. Процесс сопровождается размножением в кишечнике антибиотикоустойчивых *C.difficile*, продуцирующих токсины, разрушающие эпителий с образованием пленки из фибрина и слизи.
- Среди анаэробов повышенной резистентностью к АМП обладают *C.difficile* и клостридии, относящиеся к RLC группе (*C.ramosum*, *C.innocuum*, *C.clostridioforme*)



Определение чувствительности к АМП

- CLCI рекомендует проводить определение МПК методом микроразведений в бульоне или методом разведений в агаре с использованием бульона (агара) для бруцелл с добавлением 5мг/л гемина, 1 мг/л витамина К, 5% лошадиной крови
 - EUCAST для определения чувствительности к АМП рекомендует использовать агар или бульон Мюллера-Хинтона с добавлением 5% дефинибринированной лошадиной крови и 20мл/л НАД. Рекомендуется метод МПК или Е-тест.
- 

Лабораторная диагностика

- Бактериоскопический метод и РИФ
- Бактериологический
- Серологический – определение токсинов в РНГА, ИФА, латекс-агглютинации
- Биологический РН на белых мышах
- ИХА, ПЦР для определения токсинов



Сульфитредуцирующие клостридии – санитарно-показательные микроорганизмы

- Количественному учету при исследовании объектов окружающей среды – пищевых продуктов, почвы, воды открытых водоемов и лечебных грязей – подлежат сульфитредуцирующие клостридии –
- Для их выделения и подсчета используются дифференциально-диагностические среды, основанные на способности восстанавливать сульфиты: железо-сульфитный агар, сульфитный агар, среда Вильсона –Блера.



Нормативные документы

- Решение Комиссии Таможенного союза от 9 декабря 2011 г. N 880 "О принятии технического регламента Таможенного союза "О безопасности пищевой продукции" (с изменениями и дополнениями)
- Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 29 октября 2021 г. N 110 "О техническом регламенте Евразийского экономического союза "О безопасности мяса птицы и продукции его переработки" (с изменениями и дополнениями)
- Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 18 октября 2016 г. N 162 "О техническом регламенте Евразийского экономического союза "О безопасности рыбы и рыбной продукции"



Методические документы

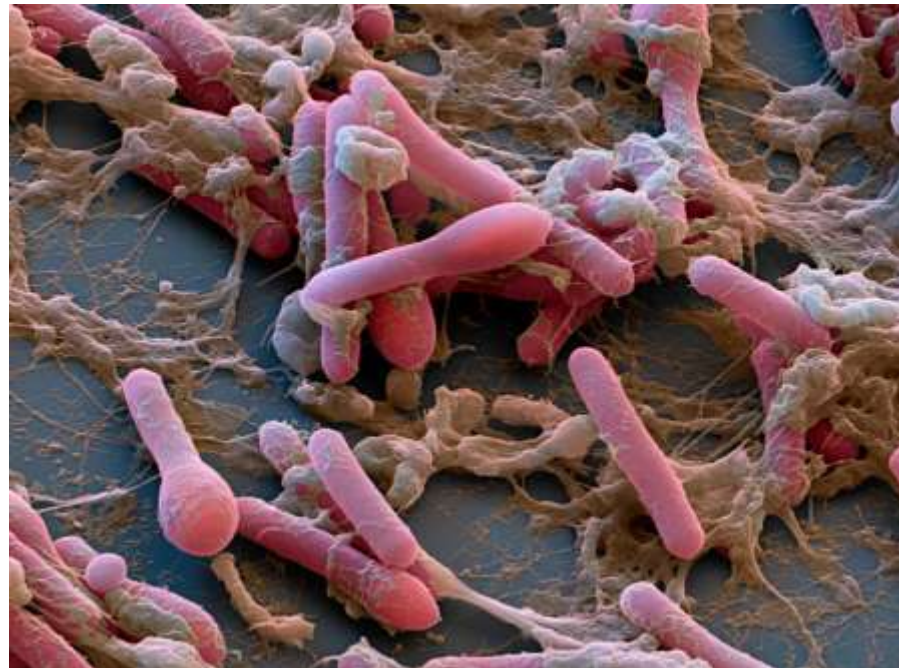
- Методические указания МУК 4.2.3695-21*
4.2. Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Методы микробиологического контроля почвы (утв. Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека 2 июня 2021 г.)

Морфологические свойства

- *C. botulinum* – грамположительные палочковидные спорообразующие подвижные бактерии, принадлежащие к роду *Clostridium*.



Clostridium botulinum

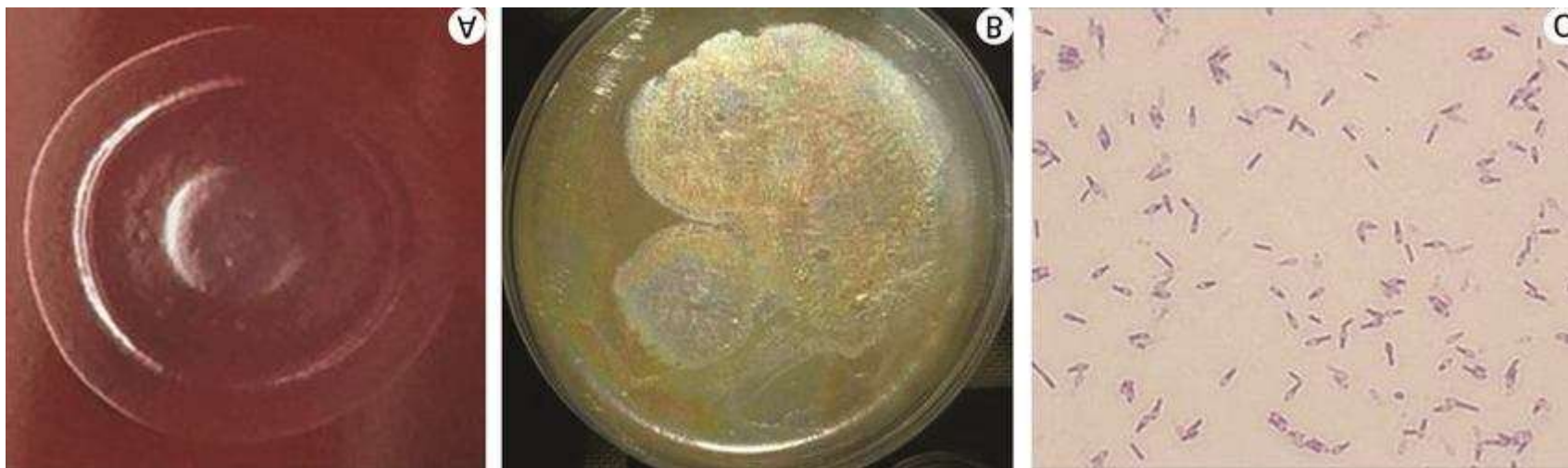




Культуральные свойства

- Строгий анаэроб
- На кровяном агаре образует мелкие колонии сероватого цвета, окруженные зоной гемолиза
- В столбике сахарного агара образует колонии R и S формы: в виде пушинок и чечевицеобразные
- На Китта-Тароцци образует газ и помутнение
- Длительность культивирования – 24 часа при температуре 28-35 градусов С

Рост *C.botulinum* на питательных средах





Биохимические свойства

- Выраженные протеолитические свойства: образует желатиназу, лецитиназу, разлагает яичный белок, выделяет сероводород
- Выраженные сахаролитические свойства
- Идентификация основана на выявлении токсинов : по типу токсинов разделяют на 8 сероваров



Токсинообразование

- Таксономическим признаком этих бактерий является их способность синтезировать ботулинический нейротоксин (ботулотоксин), вызывающий у человека и животных ботулизм. К настоящему времени у *C. botulinum* описаны и хорошо изучены семь типов ботулотоксинов: А, В, С, D, Е, F и G. Недавно идентифицирован новый восьмой серотип токсина – H-тип, называемый еще мозаичным токсином F/A. Серотипы токсинов А, В, Е и F имеют подтипы.



Токсинообразование

- Помимо *C. botulinum*, ботулотоксины типов Е и F продуцируют соответственно клостридии видов *C. argentinense*, *C. butyricum* и *C. baratii*. На основании типов и субтипов ботулотоксинов, культуральных, ферментативных и генетических свойств, а также особенностей экологии ботулотоксинпродуцирующие клостридии подразделяются на шесть фенотипических групп, существенно отличающихся друг от друга. Клостридии групп I, II, IV, V и VI вызывают ботулизм у человека, а группы III – у животных. Важно отметить, что *C. botulinum* фенотипических групп I, II и III генетически близки с нетоксигенными клостридиями соответственно видов *C. sporogenes*, *C. beijerinckii* и *C. novyi*, а токсин-образующий вид *C. argentinense* близок по свойствам к нетоксигенным клостридиям вида *C. subterminale*. Указанное родство между видами клостридий необходимо учитывать при культуральных методах выделения возбудителя ботулизма из исследуемого материала



Эпидемиология

- Сапронозная инфекция
- Резервуар: кишечник животных
- Пути передачи:
 - Фекально-оральный: пищевой (чаще консервы овощные, мясные, рыбные, грибные). Различают младенческий ботулизм при добавлении в молоко младенцев других пищевых продуктов
 - Контактный: раневой
 - Ятрогенный: инъекции ботулотоксина с терапевтическими или косметологическими целями
 - Аэрозольный: может быть использован как оружие биотерроризма

Лабораторная диагностика

- Биологический метод – «золотой» стандарт .
- Проводится в лабораториях ООИ
- Исследуют образцы крови больного, фекалии, содержимое ЖКТ, материал из раны, пищевые продукты
- Мышам внутрибрюшинно вводят биообразец и наблюдают в течение 4 дней. Признаки развиваются через 6-24 часа.
- Тип токсина определяют в реакции нейтрализации токсина антитоксическими поливалентными и моновалентными сыворотками.



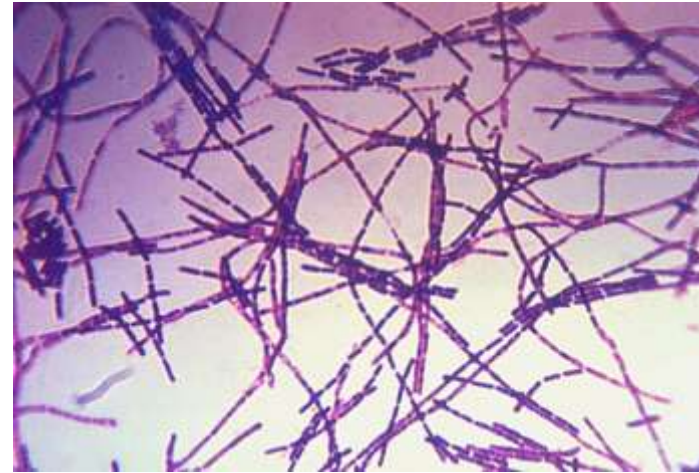
Лабораторная диагностика

Для определения токсинов

- Серологический метод : ИФА
- ИммуноПЦР
- ИХА
- Эндопептидазный тест
- ПЦР
- Секвенирование
- Бактериологический:
- обогащение
- культивирование на жидких питательных средах
- культивирование на плотных питательных средах
- Идентификация по биохимическим свойствам
- Определение токсинообразования (биопроба, ПЦР)

Сибирская язва (Anthrax) представляет собой острую особо опасную зоонозную бактериальную инфекционную болезнь, возбудитель которой относится ко II группе патогенности

Возбудитель сибирской язвы - *Bacillus anthracis*, существует в бациллярной (вегетативной капсульной и бескапсульной) и споровой формах. Споровая форма чрезвычайно устойчива к внешним воздействиям, что способствует сохранению жизнеспособности и вирулентности возбудителя в течение нескольких десятилетий.



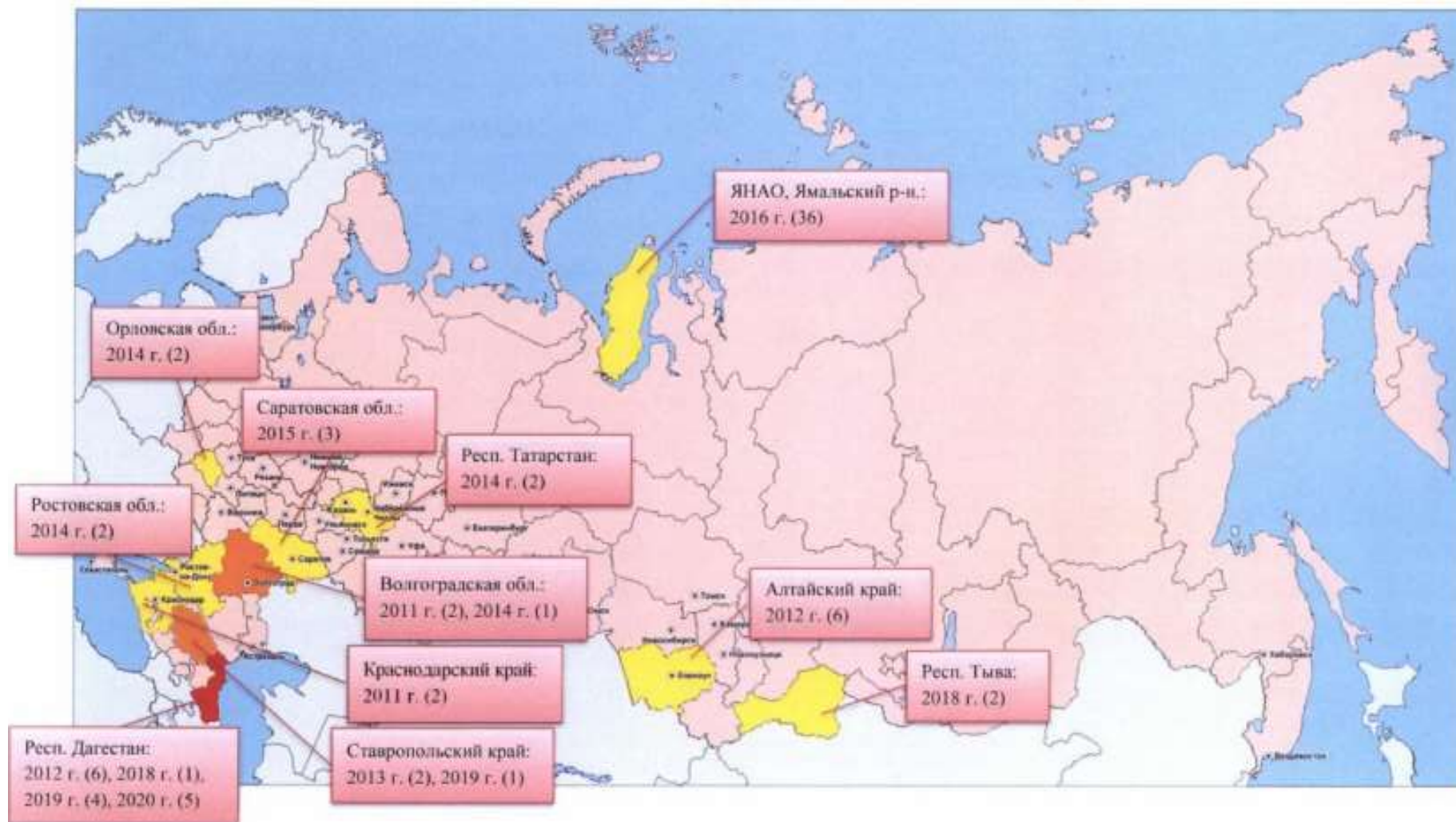


Рисунок 2. Сибирская язва среди людей в Российской Федерации в период с 2011 по 2020 гг.

Основными источниками возбудителя сибирской язвы для человека являются сельскохозяйственные животные (крупный и мелкий рогатый скот, лошади, верблюды, свиньи, олени), больные сибирской язвой. Резервуаром возбудителя сибирской язвы служит почва.



Лабораторные исследования клинического, секционного и полевого материала при подозрении на сибирскую язву проводятся лабораториями, имеющими санитарно-эпидемиологическое заключение на работу с материалом, зараженным или подозрительным на зараженность возбудителем сибирской язвы.

Исследования на сибирскую язву можно разделить на два этапа:

- 1) обнаружение возбудителя или его компонентов (ДНК, антигенов) в организме больных людей, животных, секционном материале или объектах окружающей среды, с которыми имели контакт заболевшие и которые могли быть источником инфицирования;
- 2) выделение и идентификация чистой культуры возбудителя с последующим изучением ее свойств.

Диагностика включает:

- световую и люминесцентную микроскопию мазков из нативного материала
- постановку полимеразной цепной реакции (ПЦР)
- Бактериологический метод, комплексную идентификацию выделенных культур
- биологические методы исследования
- использование иммунологических методов (нМФА, РНГА, ИФА, при исследовании материала от животных - реакция преципитации)
- аллергодиагностику



Микробиологическое исследование при сибирской язве

I этап



Микробиологическое исследование при сибирской язве

II-III этапы

Учёт результатов посева



Выделенные штаммы возбудителя сибирской язвы передаются в референс-центр по мониторингу за возбудителем сибирской язвы ФКУЗ Ставропольский НИПЧИ и Национальный центр верификации результатов диагностической деятельности, выполняющий функции Государственной коллекции патогенных бактерий, для проведения окончательной идентификации, молекулярного типирования штаммов возбудителя сибирской язвы, а также пополнения национального коллекционного фонда.



Нормативно-методические документы

- СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней»
- Приказ Роспотребнадзора №1116 от 01.12.2017 «О совершенствовании системы мониторинга, лабораторной диагностики инфекционных и паразитарных болезней и индикации ПБА в Российской Федерации
- МУК 4.2.2413-08 Лабораторная диагностика и обнаружение возбудителя сибирской язвы

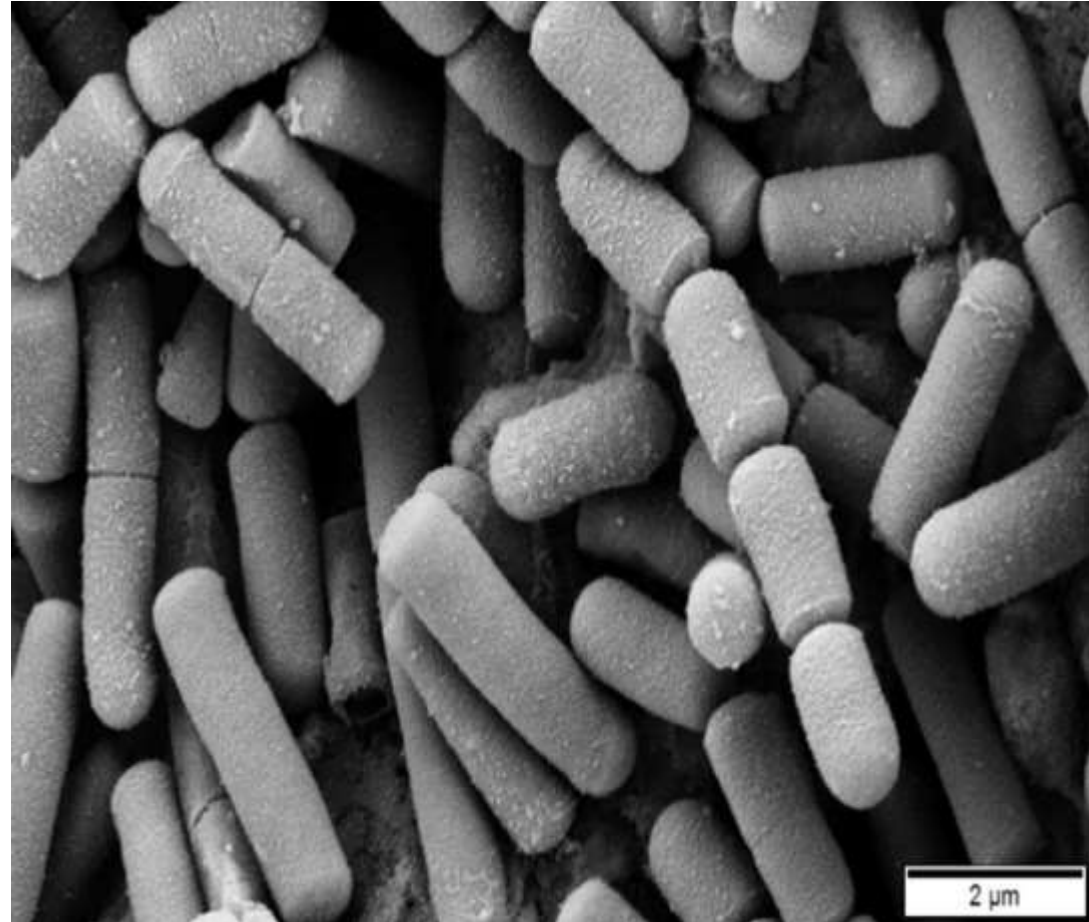


Bacillus cereus

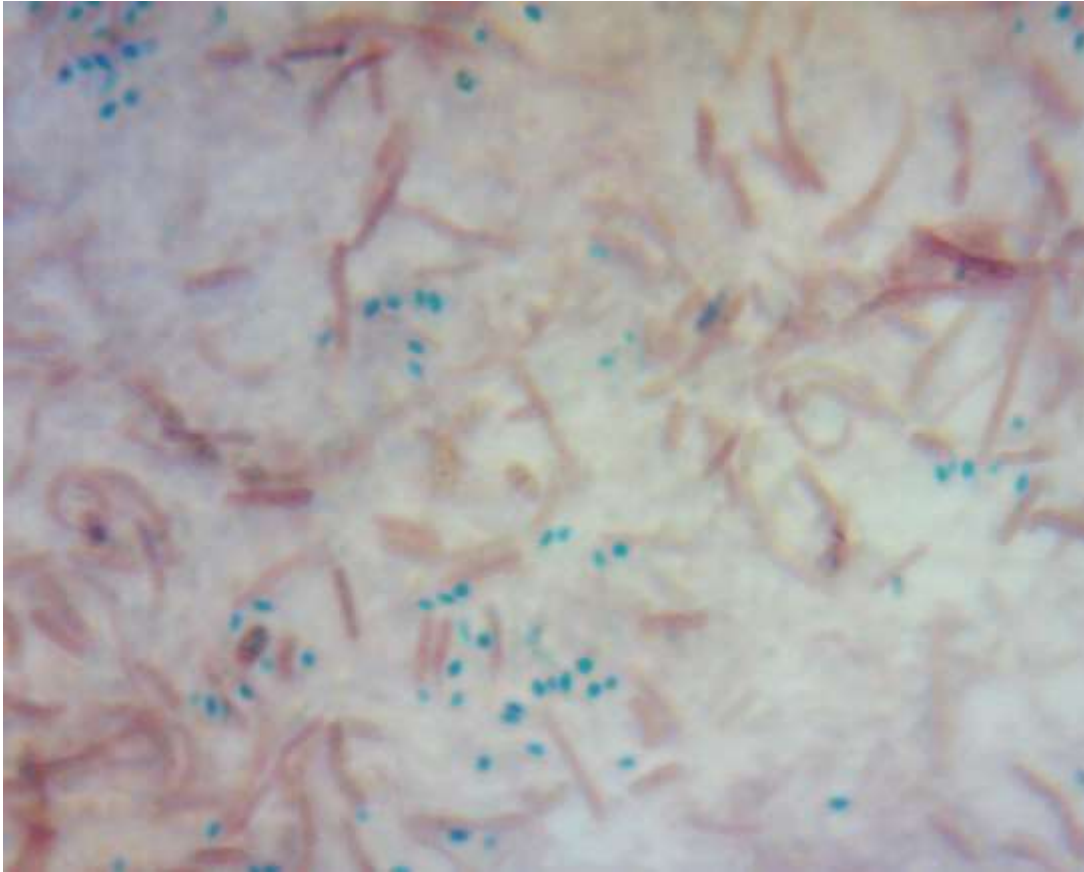
- грамположительная палочковидная бактерия
- Подвижная за счет жгутиков, перитрих
- Спорообразующая
- Название »*cereus*» , означающее «восковой» на латыни , относится к внешнему виду колоний, выращенных на кровяном агаре .

Таксономия

Domain:	Bacteria
Phylum:	Bacillota
Class:	Bacilli
Order:	Bacillales
Family:	Bacillaceae
Genus:	Bacillus
Species:	<i>B. cereus</i>



Морфологические свойства



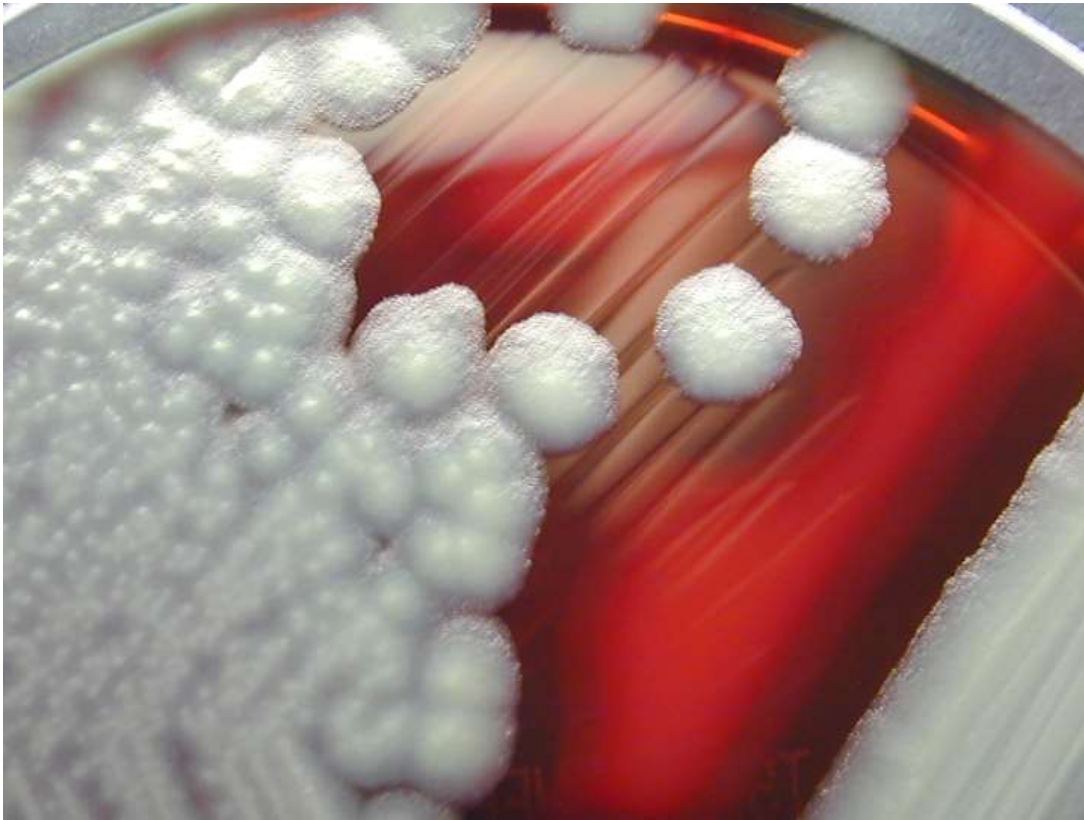
- Подобно другим представителям рода Bacillus , могут продуцировать защитные эндоспоры . Эти бактерии являются как спорообразующими , так и био пленкообразующими , что представляет серьезную проблему для пищевой промышленности из-за их способности контаминировать.



Культуральные свойства

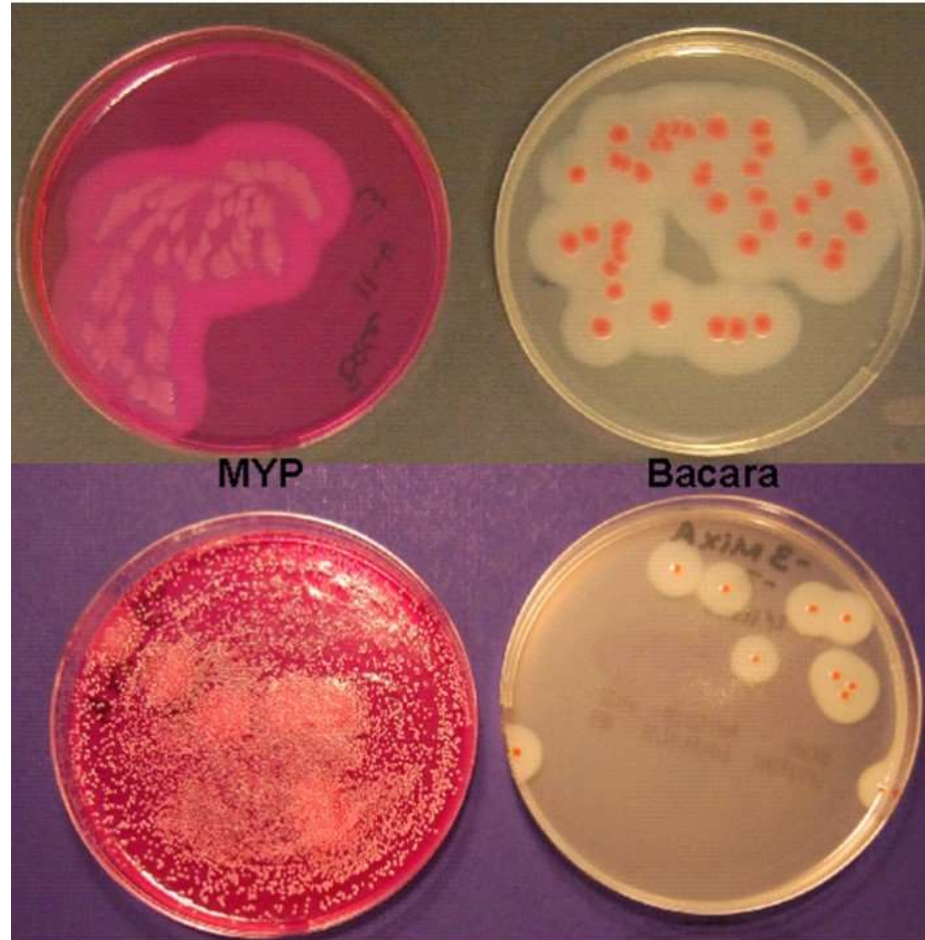
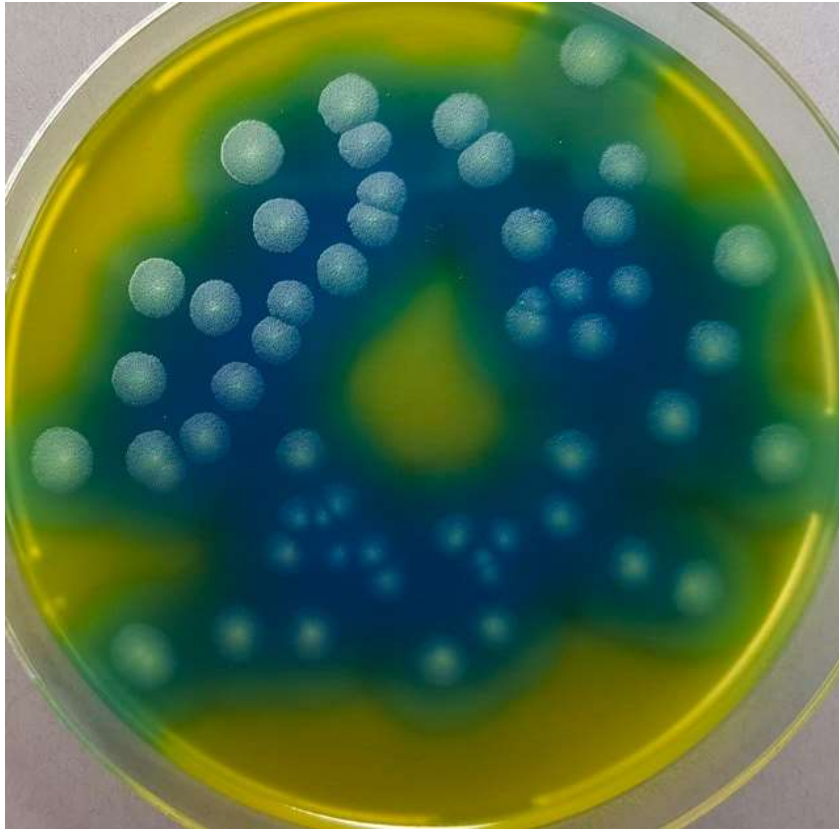
- Бактерии *B. cereus* могут быть анаэробами или факультативными анаэробами.,
- В зависимости от штамма он может быть анаэробным или факультативно анаэробным. Большинство штаммов являются мезофильными , имеющими оптимальную температуру от 25 ° С до 37 ° С, и нейтралофильными, предпочитающими нейтральный pH, но было обнаружено, что некоторые из них растут в среде с гораздо более экстремальными условиями

Культуральные свойства



- Растет на простых и специальных средах
- Из-за способности *B. cereus* продуцировать лецитиназу и ее неспособности ферментировать маннит существуют некоторые подходящие селективные среды для его выделения и идентификации, такие как маннит-яичный желток-полимиксин (МҮР) и полимиксин-пируват-яичный желток-маннитол-бромтимоловый синий агар (РЕМВА). Колонии *B. cereus* на МҮР имеют фиолетово-красный фон и окружены зоной яично-желткового осадка.

Рост на РЕМВА и МҮР агаре



Колонии *B. cereus* на МҮР агаре.

На МҮР:
розовые,
лецитиназа(+), но
другие бактерии не
подавляются.

На Bacara:
розово-оранжевые,
лецитиназа(+), но
др. организмы
подавлены.



Биохимические методы

- [Анаэробный рост](#) : положительный
- [Тест Фогеса-Проскауэра](#) : положительный
- Образование кислоты:
 - D -глюкоза: положительный
 - L -арабиноза: отрицательный
 - D -ксилоза: отрицательный
 - D -маннитол: отрицательный
- [Гидролиз](#) крахмала : положительный
- [Восстановление нитратов](#) : Положительный
- Деградация [тирозина](#) : положительный
- Рост при
 - выше 50 °C: отрицательный
- Утилизация [цитрата](#) : положительный



Эпидемиология и патогенез

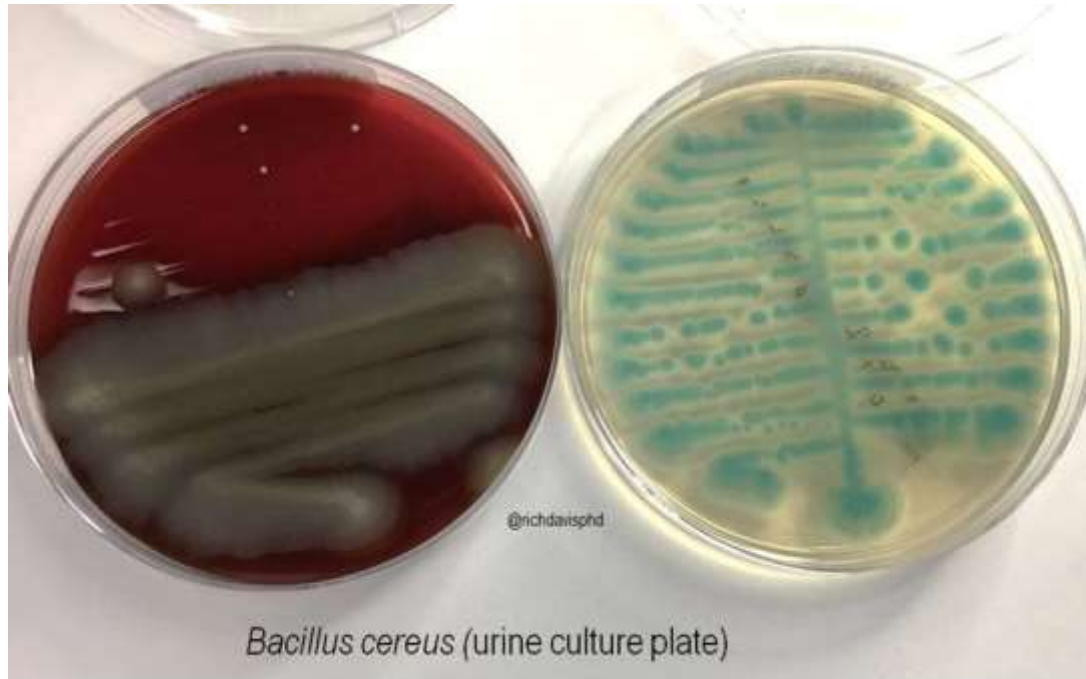
- обычно встречается в почве , пищевых продуктах.
- Сапроноз
- Путь передачи: пищевой
- Некоторые штаммы вызывают пищевые отравления
- Они имеют широкий спектр факторов вирулентности , включая фосфолипазу С , сфингомиелиназу, металлопротеазы и цереоулид (эметический рвотный токсин)
- Диарейные синдромы, наблюдаемые у пациентов, связаны с тремя токсинами: гемолизином BL (Hbl) - цереолизином, негемолитическим энтеротоксином (Nhe) и цитотоксином



B. cereus –санитарно-показательный микроорганизм

- Регламентируется содержание в пищевых продуктах (мясных, молочных, консервах, продуктах для детского и диетического питания)

Лабораторная диагностика



- Бактериологический метод

Посев на специальные и дифференциально-диагностические среды

Идентификация по морфологическим, культуральным и биохимическим свойствам



Нормативные документы

- Решение Комиссии Таможенного союза от 9 декабря 2011 г. N 880 "О принятии технического регламента Таможенного союза "О безопасности пищевой продукции" (с изменениями и дополнениями)
- Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 29 октября 2021 г. N 110 "О техническом регламенте Евразийского экономического союза "О безопасности мяса птицы и продукции его переработки" (с изменениями и дополнениями)
- Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 9 октября 2013 г. N 67 "О техническом регламенте Таможенного союза "О безопасности молока и молочной продукции" (с изменениями и дополнениями)
- Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 18 октября 2016 г. N 162 "О техническом регламенте Евразийского экономического союза "О безопасности рыбы и рыбной продукции"



Методические документы

- Методические рекомендации по проведению бактериологических исследований при пищевых отравлениях (Утв. Начальником Главного управления эпидемиологии и гигиены Министерства здравоохранения РСФСР от 17 августа 1990 г. N 17 РС-14/5735)
- Методические указания МУК 4.2.1035-01 "Контроль дезинфекционных камер" (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 23 мая 2001 г.) – в качестве тест культур проверки спор на термоустойчивость

Эффективность дезинфекционных средств, учитываемая при организации проведения дезинфекционных мероприятий

Бактерицидная и спороцидная активность средств, предназначенных для дезинфекции при особо опасных инфекциях (чума, холера, туляремия, сибирская язва)	Гибель на всех объектах 100,0% тест-бактерий (Escherichia coli, Staphylococcus aureus, споры B.cereus) или соответствующих возбудителей (Yersinia pestis, Vibrio cholerae, Francisella tularensis, Bacillus anthracis)
---	--

• [Постановление Главного государственного санитарного врача РФ от 28 января 2021 г. N 4 "Об утверждении санитарных правил и норм СанПиН 3.3686-21 "Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней" \(с изменениями и дополнениями\)](#)



Благодарю
за внимание!