

КАЗАНСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ



Микробиология инфекций,
вызываемых аспорогенными
анаэробными
микроорганизмами

Исаева Г.Ш.

Зав. каф. микробиологии имени
академика В.М. Аристовского



Бактероиды (лат. *Bacteroides*)

род грамотрицательных анаэробных палочковидных бактерий семейства *Bacteroidaceae*.

- Являются представителями нормальной микрофлоры человека. Бактероиды — наиболее типичные нормальные обитатели кишечника человека, составляющие около половины всей его микрофлоры. Основное место обитания бактериоидов в человеческом организме — толстая кишка.
- В кале здоровых людей обнаруживается следующее количество бактериоидов: у детей первого года — 10^7 – 10^8 КОЕ/г
- у детей старше года и взрослых — 10^9 – 10^{10} КОЕ/г
- у пожилых — 10^{10} – 10^{11} КОЕ/г



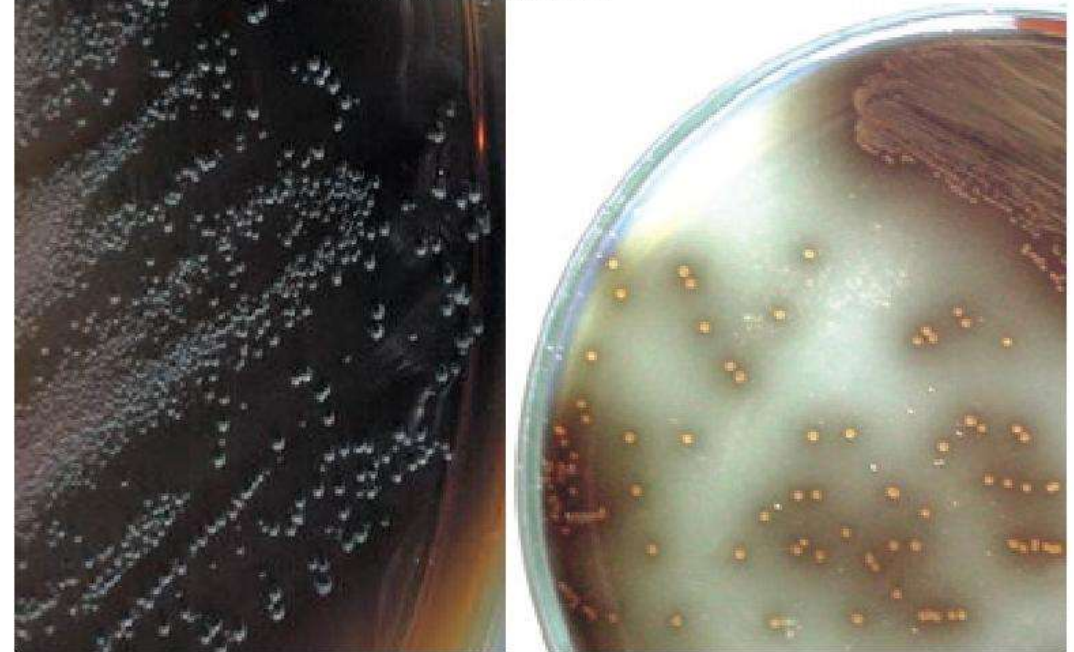
Бактероиды в составе нормофлоры

- Бактероиды также входят в состав нормальной микрофлоры женских половых органов, верхних дыхательных путей, полости рта и гортани. В норме у взрослого человека в полости рта в титре содержится не более 10^3 КОЕ/г бактероидов. Бактероиды часто находятся в полостных органах человека, связанных с внешней средой, но они отсутствуют у здоровых людей в стерильных внутренних органах и брюшной полости.

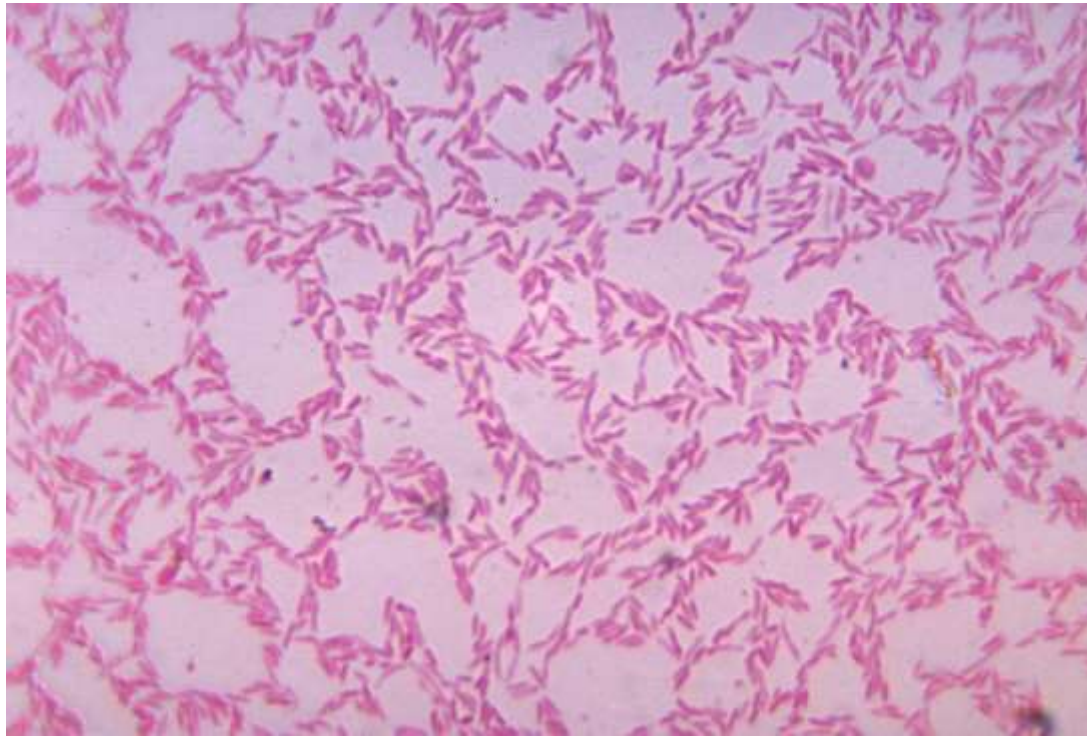
Таксономия

- Домен : Bacteria
- Тип: Bacteroidota
- Класс: Bacteroidia
- Порядок: Bacteroidales
- Семейство: Bacteroidaceae

Колонии *Bacteroides fragilis* растущие на агаре для бактероидов с желчью и эскулином Инкубированы анаэробно на 24 часа при 35С.



Морфологические свойства



- **Бактероиды**
- (лат. *Bacteroides*) — род грамотрицательных анаэробных неспорообразующих бактерий. Бактероиды полиморфны, часто имеют форму палочки с закругленными концами размером 1–3 на 0,5–0,8 мкм.
- Бактероиды не образуют спор, но могут образовывать капсулы.



Биохимические и культуральные свойства

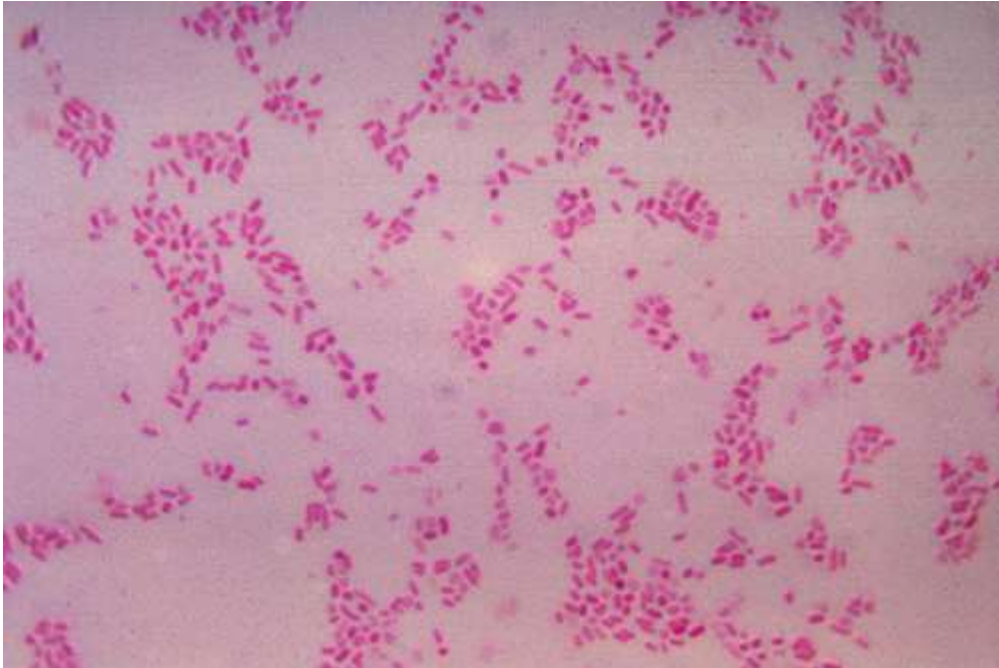
- Хемоорганогетеротрофы, облигатные анаэробы
- Культивируются на кровяном агаре, тиогликолевой среде. На плотных средах образуют жемчужно-серые или белые колонии. Могут образовывать пигмент
- Основными продуктами брожения являются уксусная кислота, изовалериановая кислота, янтарная кислота. Основным источником энергии являются полисахариды.
- Не образуют индол, синтезируют каталазу, гидролизуют эскулин, сбраживают различные углеводы.



Факторы патогенности

- Эндотоксин
- Пили
- Капсула
- Летучие и длинноцепочечные жирные кислоты
- Коллагеназа
- Фибринолизин
- Нейраминадаза
- ДНК аза
- Энтеротоксин

Bacteroides fragilis



- неподвижные, образующие капсулу бактерии.
- Капсулы обладают значительной толщиной, превышая размер клетки в 3–6 раз.



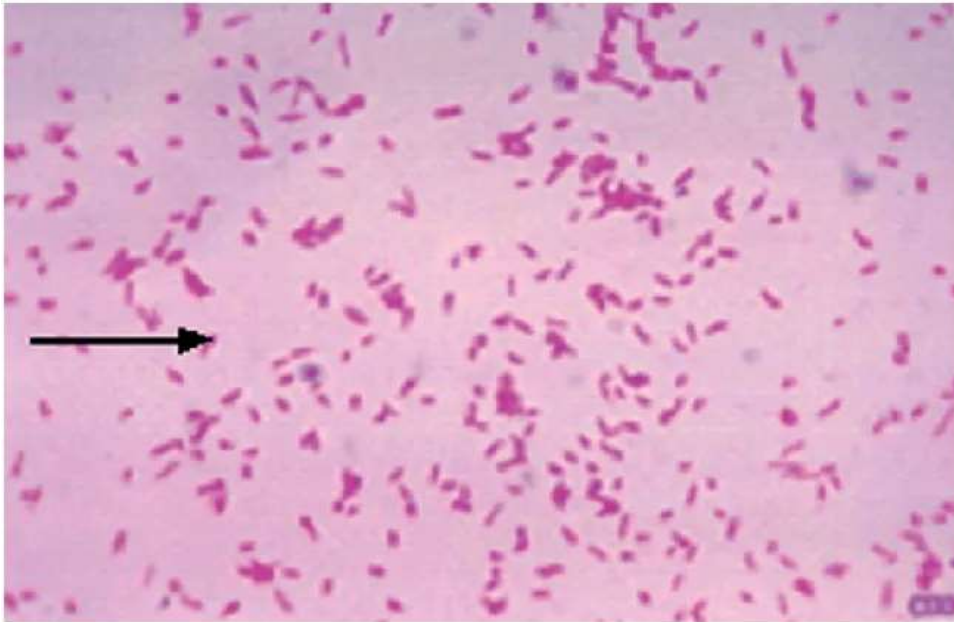
Роль в патологии человека

- *Bacteroides fragilis*, как и другие бактероиды, могут вызывать различные гнойно-воспалительные заболевания после травм, оперативных вмешательств, инструментальных исследований, при онкопатологиях или иммунодефиците.

Bacteroides fragilis могут быть причиной как внутрибрюшинных инфекций, таких как перитонит, хронический язвенный колит, так и синовита, сальпингита, болезни Рейтера, хронического тонзиллита, цервицита, эндометрита, аднексита, инфекции в малом тазу, а также простатита, хронически протекающего осложнённого мужского уретрита.

Превотеллы

- **Таксономия**
- Семейство: *Prevotellaceae*
- Род: *Prevotella*
- Виды: *P. albensis*, *P. amnii*, *P. aurantiaca*, *P. baroniae*, *P. bergensis* и др



- **Внесенные изменения в классификацию** (новое наименование – старое наименование)
- Ранее многие виды *Prevotella* классифицировались как виды или подвиды бактерий рода *Bacteroides*, в частности:
 - *Prevotella albensis* – *Bacteroides ruminicola* subsp. *Ruminicolabiovar*;
 - *Prevotella bivia* – *Bacteroides bivius*;
 - *Prevotella brevis* – *Bacteroides ruminicola* subsp. *Brevis*;
 - *Prevotella bryantii* – *Bacteroides ruminicola* subsp. *brevis* biovar 3;
 - *Prevotella buccae* – *Bacteroides pentosaceus*, *Bacteroides capillusu* *Bacteroides buccae*;
 - *Prevotella corporis* – *Bacteroides corporis*;
 - *Prevotella denticola* – *Bacteroides denticola*;
 - *Prevotella disiens* – *Bacteroides disiens*;
 - *Prevotella intermedia* – *Bacteroides melaninogenicus* subsp. *Intermedius*;
 - *Prevotella loescheii* – *Bacteroides loescheii*.

Морфологические свойства

Prevotella bivia



рис. 3.73. Мазок из чистой культуры *P. bivia*. Окраска Граму.

- Бактерии рода *Prevotella* Гр (-). В мазке представляют собой располагающиеся скопления полиморфные палочки размером от 1,5-5 мкм в длину и 0,7 мкм в ширину. Неподвижные, не образуют спор.



Культуральные свойства

- Среды для выращивания бактерий рода *Prevotella*
 - Для культивирования бактерий рода *Prevotella* используются среды, содержащие кровь, например, агар Шедлера с 5% овечьей кровью, кровяной агар, агар или бульон с сердечно-мозговой вытяжкой и т. д.
- Характер роста
 - На чашках с кровяным агаром формируют округлые, выпуклые, блестящие и гладкие колонии, чаще всего полупрозрачные или непрозрачные, серого, светло-коричневого или черного цветов. Размеры колоний варьируют от 1,2 до 1,8 мм в диаметра. Культуры на глюкозном бульоне мутные, с волокнистым осадком.



Требования к культивированию

- *Облигатные анаэробы. Оптимальная температура роста 37 °С. Для роста большинства видов необходимы гемин и менадион.*
- Продолжительность культивирования
- Продолжительность культивирования составляет 96 часов



Биохимические свойства

- **Биохимическая активность**

- Протеолитическая активность вариабельна.

Большинство видов имеют ограниченную способность ферментировать аминокислоты. Нитраты до нитритов не восстанавливают. Практически все виды индолоотрицательны.



Факторы патогенности

- Фимбрии:
 - данные микроорганизмы имеют 4 вида фимбрий, одна часть штаммов использует только один вид фимбрий, другая часть штаммов – сразу несколько типов одновременно, третья часть – вообще не образует фимбрии.
- Липополисахариды:
 - гидролазы – цистеиновая протеаза ЛПС-связывающего белка усиливает вирулентность ЛПС.
- Гемолизин:
 - многокомпонентные гемолизины находятся в везикулах наружной мембраны, в комбинации со специфическими фимбриями.
- Протеазы: сериновая протеаза; дипептидил пептидаза IV; цистеиновая протеаза.

Порфиромонады

Domain:	Bacteria
Phylum:	Bacteroidota
Class:	Bacteroidia
Order:	Bacteroidales
Family:	Porphyromonadaceae
Genus:	<i>Porphyromonas</i>

**(Porphyros-пурпурный,
monas – неделимое,
единица)**

**Порфиромонады или
порфиромонасы**

(Porphyromonas) — род
неспрообразующих,
грамотрицательных,
анаэробных, неподвижных
бактерий.



Экология порфиромонад

Виды порфиромонад *Porphyromonas asaccharolytica*, *Porphyromonas endodontalis* и *Porphyromonas gingivalis* обнаруживают в ротовой полости, а также в верхних отделах желудочно-кишечного тракта, дыхательных путей и в толстой кишке.

Porphyromonas могут находиться в желудке здоровых людей (при условии отсутствия в нём в доминирующем количестве *Helicobacter pylori*)



Роль в патологии человека

Порфириомонады вызывают различные стоматологические заболевания, поражения мягких тканей головы и шеи, аспирационные пневмонии.

Основные клинические формы: гингивит, пародонтит, абсцессы, флегмоны, эмпиема плевры, перитониты



Порфириомонады

- *P. bennonis* — выделены из клинических материалов человека
- *P. cangingivalis* — выделены из периодонтальных карманов собак, возбудители периодонтита животных
- *P. canoris* — выделены из поддесневых бляшек собак
- *P. catoniae* — выделены из десневых борозд человека
- *P. circumdentaria* — выделены из подкожных абсцессов у кошек
- *P. gingivalis* — пародонтопатоген, выделены из ротовой полости человека
- *P. gulae* — выделены из десневых борозд волка
- *P. levii* — выделены из рубцов крупного рогатого скота
- *P. macacae* — выделены из периодонтальных карманов макак
- *P. pasteri* — выделены из [слюны](#) человека
- *P. rogonaе* — выделены из клинических материалов человека
- *P. somerae* — выделены из язв на ноге человека
- *P. uenonis* — выделены из крестцовых пролежней человека

Культуральные свойства



- Облигатные анаэробы
- Растут на кровяном агаре, образуя гладкие крупные блестящие колонии
- *P.gingivalis* на кровяном агаре образует колонии черного цвета
- Колонии *Porphyromonas
gulae*, растущие на чашке с трипсино-соевым агаром



Биохимические свойства

- Виды отличаются протеолитической и сахаролитической активностью
- Все виды образуют индол



Факторы патогенности

- Эндотоксин
- Пили
- Летучие жирные кислоты
- Нейраминидаза
- Протеазы (IgA – протеазы)

Экология *Porphyromonas gingivalis* и роль в патологии

Он обнаруживается в полости рта, где участвует в заболеваниях пародонта , а также в верхних отделах желудочно-кишечного тракта , дыхательных путях и толстой кишке . Он был выделен от женщин с бактериальным вагинозом

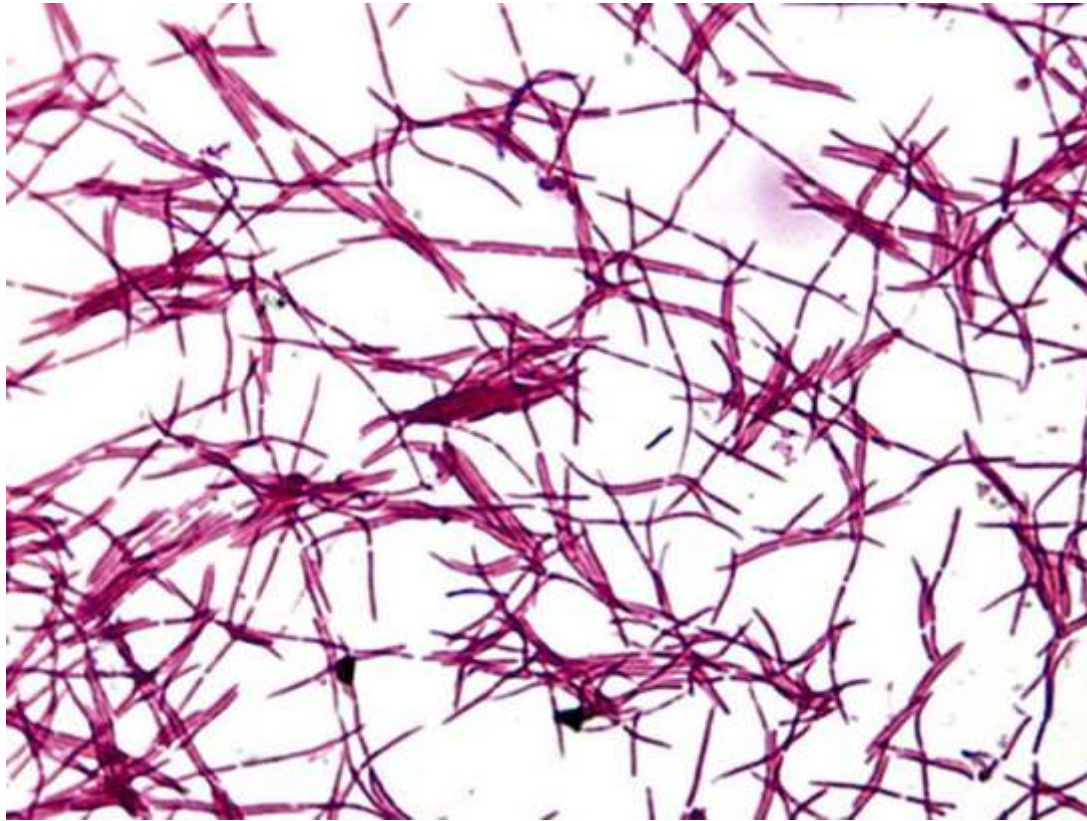
- Один из основных пародонтопатогенных микроорганизмов, способный к инвазии и внутриклеточному паразитизму.
- Основные клинические формы: гингивит, пародонтит, абсцессы и флегмоны, инфекционный эндокардит



Патогенность

- Капсула
- Адгезины
- фимбрии
- Протеазы
- Инвазивность
- Внутриклеточный факультативный паразитизм
- При воспалении и кровотечении, сопровождающих инвазию соединительной ткани десны могут поступать в кровоток (бактериемия) и формировать отдаленные очаги инфекции, что лежит в основе связи между заболеваниями пародонта и ССС (инфекционный эндокардит, ишемическая болезнь сердца и стенокардия)

Leptotrichia species



- Семейство: *Leptotrichiaceae*
- Род: *Leptotrichia*
- Виды: *Leptotrichia buccalis*, *L. trevisanii*, *L. amnionii*, *L. shanii* и др.
- Бактерии рода *Leptotrichia* Гр (-). В мазке представляют собой прямые или слегка изогнутые палочки с заостренными или закругленными концами размером 0,5-3,0×5-15 мкм. В мазке расположены парами, отдельными нитями или цепочками, часто с уплощенными концами. Неподвижные, спор не образуют.
- Облигатно-анаэробные микроорганизмы.



Культуральные свойства

Среды для выращивания бактерий рода *Leptotrichia*: Для культивирования бактерий рода *Leptotrichia* используются такие среды, как сердечно-мозговой агар с 0,2% дрожжевым экстрактом, сердечно-мозговой бульон. *Растут на средах с сывороткой или кровью (например, агар МакКонки или шоколадный агар).*

Характер роста Морфология колоний зависит от питательной среды. В большинстве случаев *Leptotrichia* образуют бесцветные, гладкие, блестящие, приподнятые над поверхностью колонии, по типу «головы медузы». Колонии *Leptotrichia* на кровяном агаре диаметром 0,5-3 мм, выпуклые, непрозрачные, поверхность неровная, напоминает извилины, по структуре редко волокнистые, серовато-коричневые, в старых культурах с тёмным центром, сухой консистенции.

Требования к культивированию: *Облигатно-анаэробные микроорганизмы. Оптимальная температура роста 35-37 °С. Прихотливы к питательным средам.*

Продолжительность культивирования составляет 48-72 часа.



Биологические свойства и роль в патологии

- **Биохимическая активность**
- *Хемоорганотрофы. Метаболизируют углеводы с образованием кислоты без газа. Основным продуктом ферментации глюкозы является молочная кислота. Уксусная и янтарная кислоты могут образовываться в незначительных количествах. Не продуцируют индол и сероводород.*
- **Факторы патогенности : эндотоксин, пили**
- **Клиническое значение**
- Микроорганизмы, способствующие образованию и развитию бактериального вагиноза и гнойно-воспалительных заболеваний различной локализации

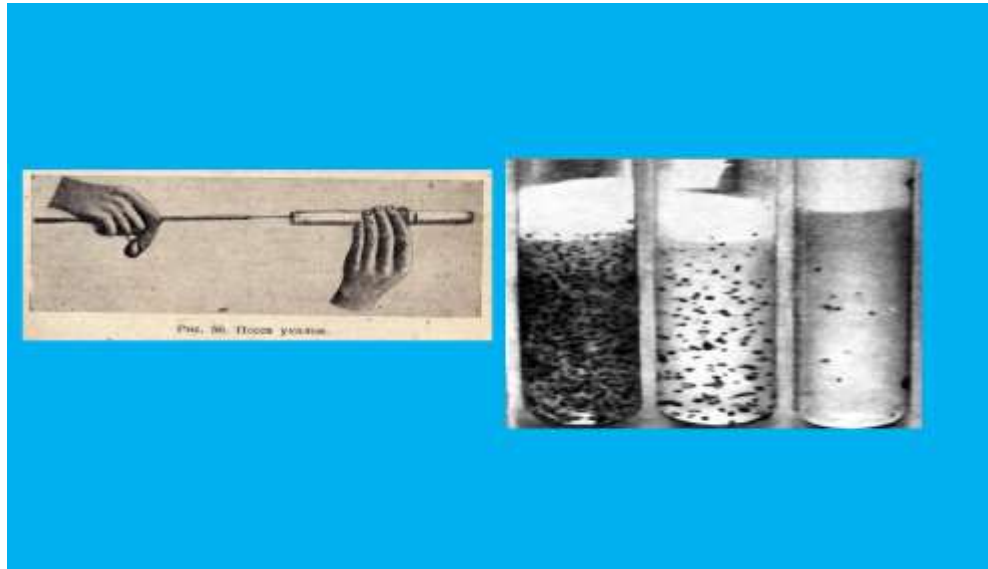


Бактериологический метод

- Выделение чистой культуры осуществляют по методу Цейссlera или Вейнберга
- Культивируют в анаэробных условиях (анаэроостаты, эксикаторы, по Фортнеру и тп)
- Выросшие колонии идентифицируют по культуральным, морфологическим, биохимическим свойствам
- Изучение конечных продуктов метаболизма с помощью газожидкостной хроматографии

Методы культивирования анаэробов

- 1. физические методы:
- Удаление воздуха из герметических сосудов (анаэроостаты) и заменой на бескислородные смеси
- Посев в высокий столбик агара



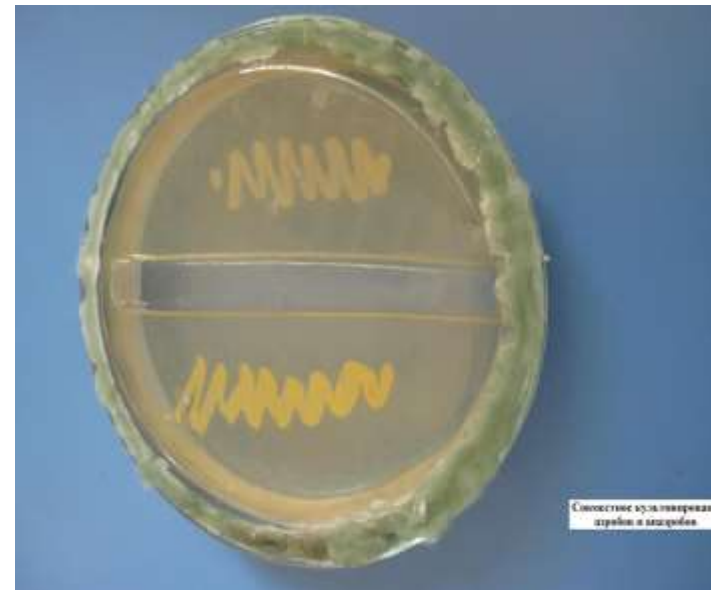
2. Химические методы

1. Поглощение кислорода в замкнутой воздушной среде химическими веществами (пиррогалол)
2. Применение газогенерирующих пакетов в замкнутой воздушной среде (эксикатор, газонепроницаемые пластиковые пакеты)



3. Биологические методы

1. Совместное культивирование аэробов и анаэробов (метод Фортнера)
2. Культивирование на тканевых питательных средах (Китта-Тароцци) с заливкой слоем парафина или вазелина



Автоматические системы культивирования анаэробов (ANOXOMAT)

- Возможность создания анаэробной атмосферы (10% CO₂, 80% N₂, 10% H₂)
- Возможность создания собственных параметров атмосферы культивирования



АНАЭРОБНЫЕ БОКСЫ

- Наиболее сложным подходом является пересев и культивирование **в анаэробных боксах**.
- Это прозрачные камеры со шлюзами и отверстиями для рук с рукавами, заканчивающимися резиновыми перчатками.
- В них создают стерильные условия, заполняют бескислородной газовой смесью, поддерживают температуру 37°C.

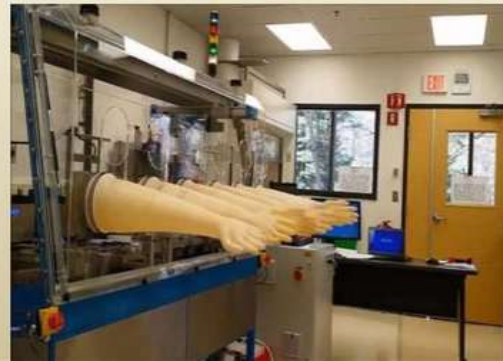
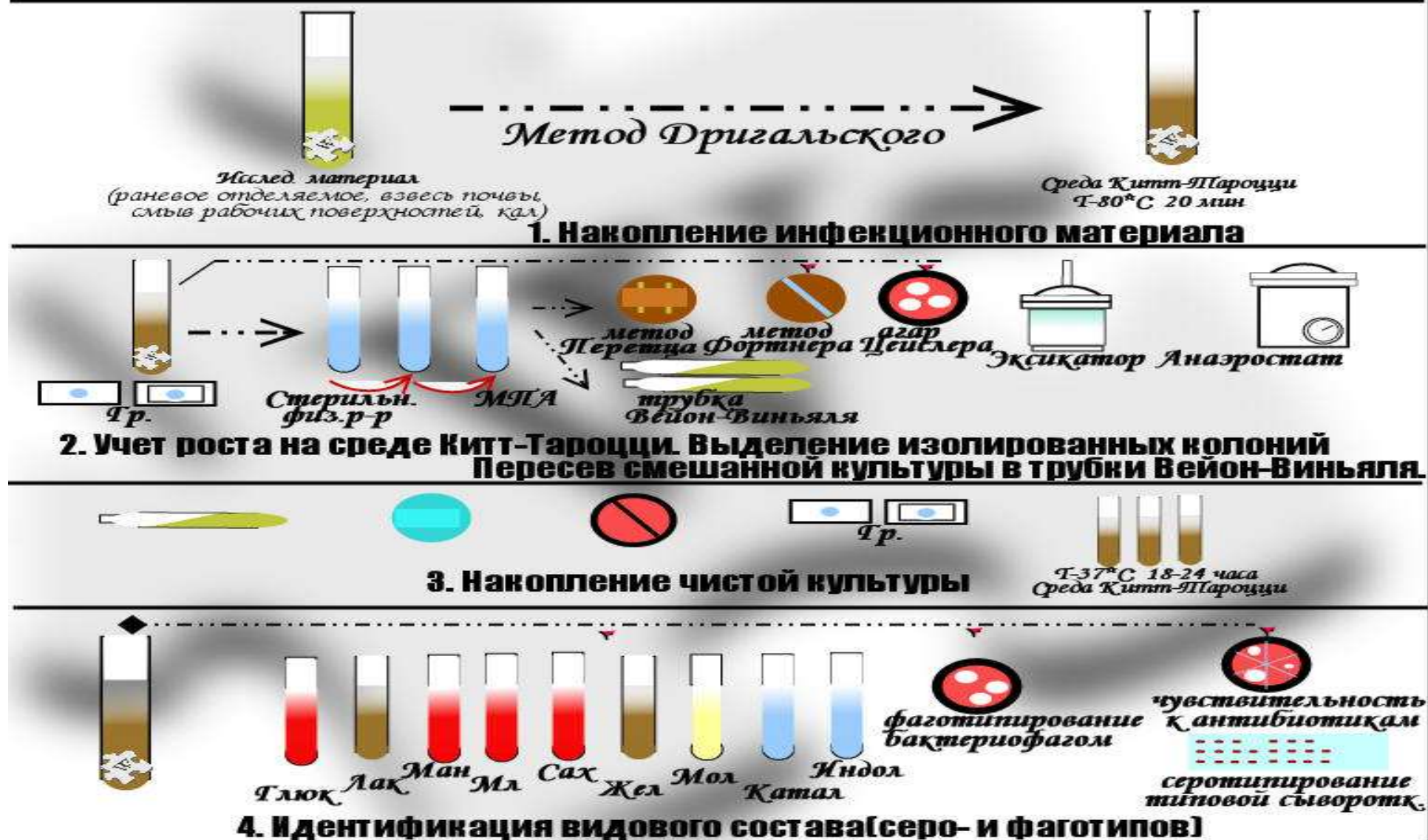


Схема выделения чистой культуры спорообразующих анаэробных микроорганизмов



Материал для исследования

- Анаэробные бактерии требовательны к условиям культивирования, кислород для них губителен, поэтому забор материала осуществляют шприцом с притертым поршнем, из которого удален кислород. Транспортировку осуществляют в шприце, надев на иглу резиновую стерильную пробку.
- Не целесообразно исследовать мокроту, мазки с поверхности ран, свободно выпущенную мочу.

ВЗЯТИЕ МАТЕРИАЛА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ НА АНАЭРОБЫ

<u>Область</u>	<u>Материал и способ получения</u>
Ротоглотка, синусы	Аспират и биоптаты после обработки слизистой провидон-йодом
Легкие	Транстрахеальный аспират, легочный аспират
Абдоминальная область	Перитонеальная жидкость, пунктат абсцесса
Женские половые органы	Лапароскопический материал, операционный материал, аспират после деконтаминации кожи и слизистых
Кости и суставы	Биоптаты и пунктат
Мягкие ткани	Пунктат после деконтаминации кожи и слизистых, биоптаты, отделяемое из глубоких отделов раны

Бактериологическая диагностика анаэробных инфекций. 1 этап

Материал: биоптат (кусочки некротизированных тканей), экссудат, гной, отделяемое ран, кровь, секционный материал

Транспортные системы: (обеспечивать сохранение жизнеспособности м/о, причем не менее 8 – 12 часов при комнатной температуре, предупредить или лимитировать размножение м/о)
-стерильные герметически закрывающиеся контейнеры (доставка: немедленно)
-коммерческие транспортные среды твердые и жидкие со средой Амнеса с активированным углем, тиогликолевая среда, Карн-Блэира (доставка: 12-48 часов, от производителя)
-СКС (высокий столбик) (доставка: 2 часа)



1 ЭТАП

1. Посев материала методом истощающего штриха на:

- анаэробный кровяной агар (среда Цесслера)
- среда СКС-199 (тиогликолевая среда)
- среда СКС-199 с налидиксовой кислотой (анаэробов из ассоциаций с колиформными бактериями)
- среда СКС-199 с канамицином и желчью (выделение *B. fragilis*)
- селективные среды для аэробов (Китта -Тароцци, железо-сульфитный агар и Уилсона-Блера (молоко) - образование через 3-4 часа губкообразного сгустка, погруженного в прозрачную жидкость))

2. Инкубация в анаэроостате 37°C 2-3 суток

3. Микроскопия мазка по Граму

4. Посев на аэробную и факультативно-анаэробную флору

Бактериологическая диагностика . 2 этап



2-Й ЭТАП

Получение чистой культуры анаэробов.

На этом этапе:

1. Изучить морфологические и культуральные свойства выросших колоний.

2. Посев на аэротолерантность (отобранной колонии) засевают на две чашки Петри с питательной средой. Одну чашку инкубируют в аэробных условиях, другую - в анаэробных условиях.

Для дальнейшего исследования отбирают культуры, выросшие только в анаэробных условиях (так исключают факультативные анаэробы).

2 ЭТАП (ОБЛИГАТНЫЕ АНАЭРОБЫ)

1. Просмотр колоний

2. Откол 2-3 колоний каждого типа на сектора:

– анаэробного кровяного агара

– 5% кровяного агара

3. Микроскопия мазков по Граму из колоний

4. Осмотр чашки в УФ и регистрация свечения

5. Микроскопия мазков с СКС и при обнаружении форм, отсутствующих на плотных средах - высевы по п.2

6. Инкубация:

– анаэробного кровяного агара - анаэроустат 1-4 с.

– 5% кровяного агара - аэробно

ХАРАКТЕР СВЕЧЕНИЯ В УФ

✓ **красное** - *Prevotella melaninogenica*, *Porphyromonas asaccharolytica*, *Parvimonas micra*, *Veillonella spp.*, *Clostridium ramosum*

✓ **розовое** - бактероиды, стрептококки, стафилококки

✓ **зеленое** - *Clostridium difficile*, *Clostridium innocuum*, *Fusobacterium spp.*

3 этап. Идентификация

ИДЕНТИФИКАЦИЯ

- ✓ Аэротолерантность (посев на кровяной агар с последующей инкубацией в эксикаторе)
- ✓ Характер роста на жидких средах
- ✓ Ферментация глюкозы
- ✓ Образование индола
- ✓ Редукция нитратов
- ✓ Гидролиз эскулина
- ✓ Чувствительность к канамицину, полимиксину, ристомицину, желчи

При выделении грамположительных палочек (клостридии)

- ✓ Гидролиз желатины
- ✓ Лецитовителаза

ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ АНАЭРОБОВ

Индукцибельные ферменты – инкубация в анаэробных условиях

- Анаэротест
- API-20A (биохимические стрипы-тесты, производитель bioMérieux)
- Minitек



Конститутивные (пресинтезированные) ферменты – инкубация в аэробных условиях

- AN-Ident
- RapID-ANA

Схема бактериологического исследования на анаэробы

Фрагменты мягких тканей измельчают. Костные фрагменты погружают в небольшое количество среды, отмывают вращательными движениями между ладонями.

Материал

Микроскопическое исследование

Два мазка на стекле по Граму и по методу Пешкова (синька Леффлера)

В аэробных условиях



Видовая идентификация



В анаэробных условиях



Посев в редуцированную среду Китта-Тороцки



не гретая гретая 80 С 20 мин.

содержимое пробирок заливают парафином

Метод Пешкова (синька Леффлера, прогревание 15-20с, остудить, промыть водой и докрасить 0,5 % р-ром нейтрально красного 30с.)

МР «По микробиологической диагностике заболеваний, вызванных неспорообразующими анаэробными бактериями», М1986г.



Экспресс методы

- Газожидкостная хроматография: определение в материале летучих жирных кислот, которые служат маркерами возбудителей
- Молекулярно-генетические методы (ПЦР)



Благодарю
за внимание!