

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 се
мейства *Bacteroidaceae*.

- Являются представителями нормальной микрофлоры человека. Бактероиды — наиболее типичные нормальные обитатели кишечника человека, составляющие около половины всей его микрофлоры. Основное место обитания бактероидов в человеческом организме — толстая кишка.
- В кале здоровых людей обнаруживается следующее количество бактероидов: 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



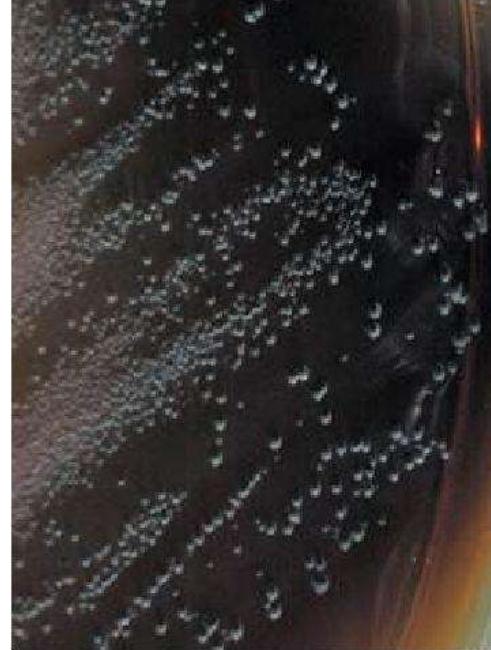
Бактероиды в составе нормофлоры

- 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.

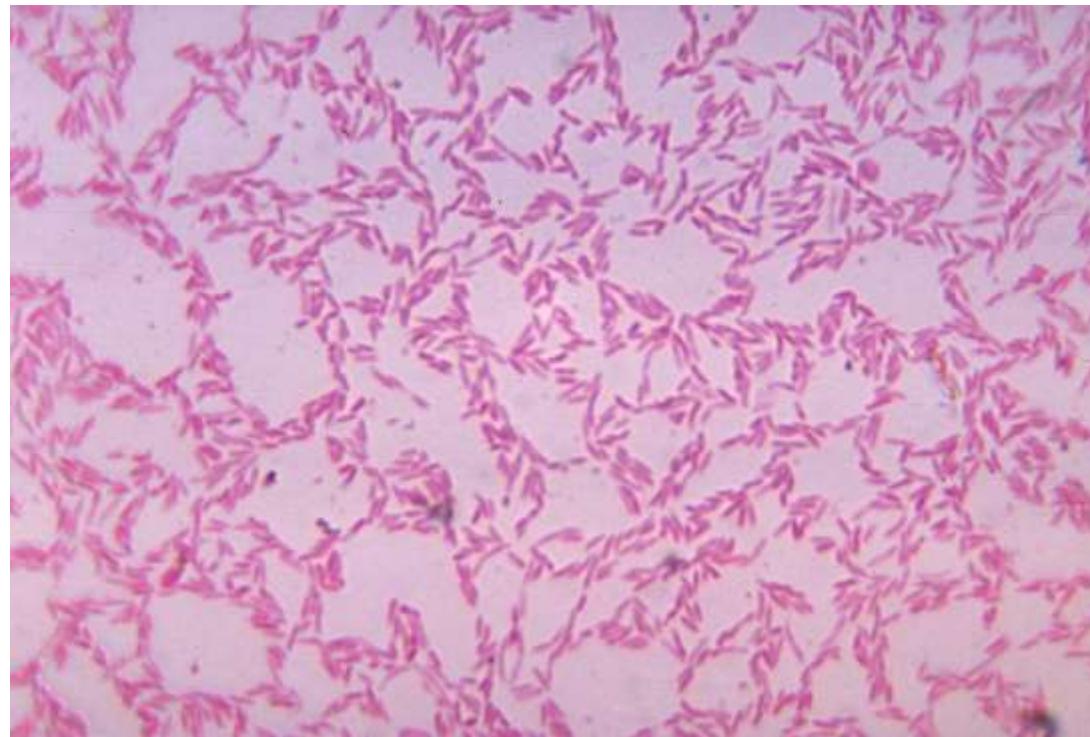
Таксономия

- 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

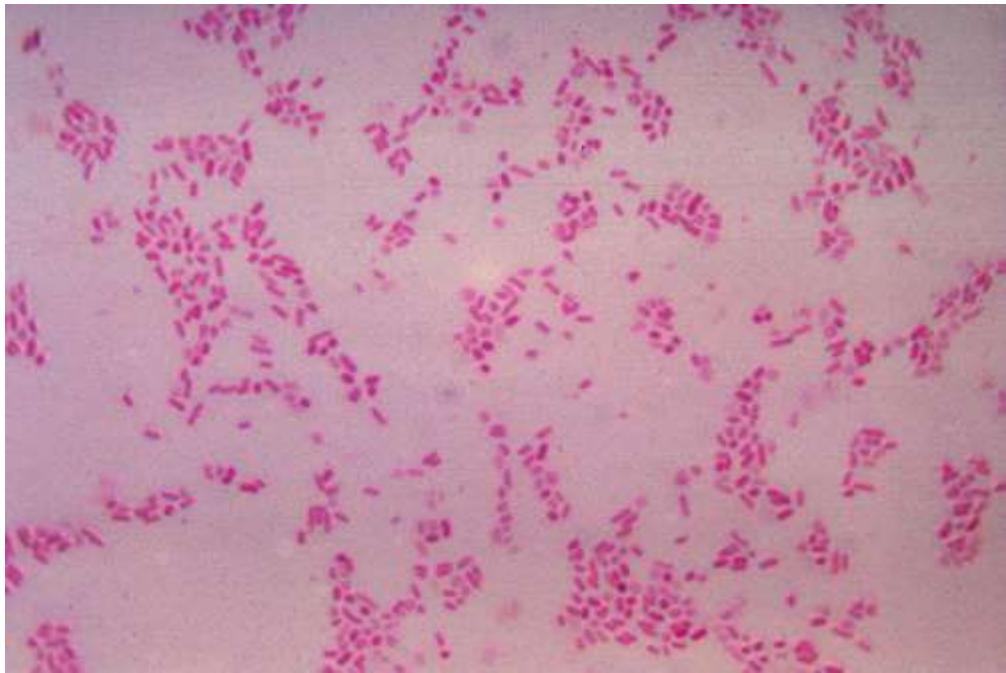
- Хемоорганогетеротрофы, облигатные анаэробы
- Культивируются на кровяном агаре, тиогликоловой среде. На плотных средах образуют жемчужно-серые или белые колонии. Могут образовывать пигмент
- Основными продуктами брожения являются уксусная кислота, изовалериановая кислота, янтарная кислота. Основным 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.



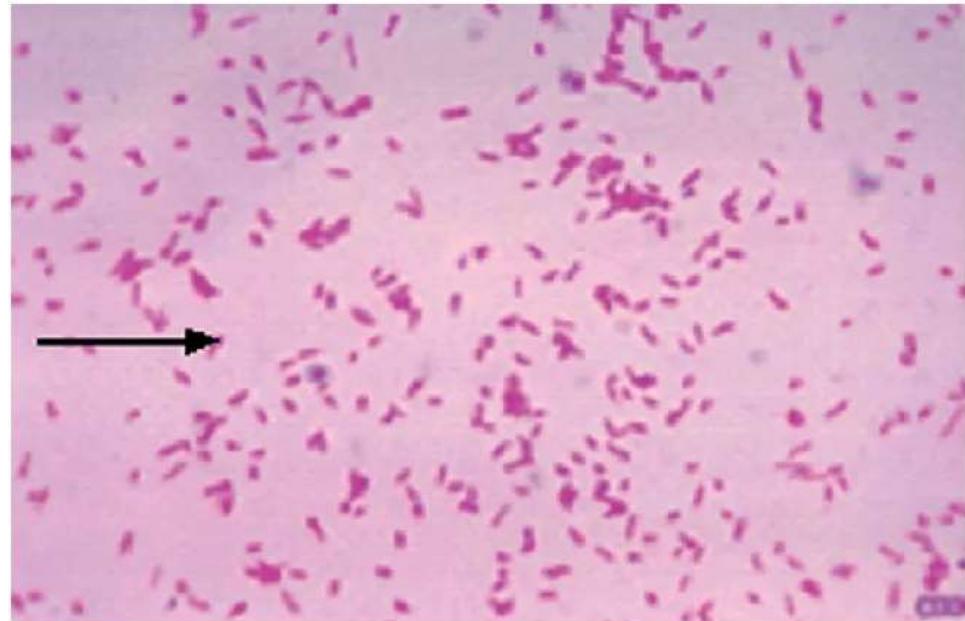
Роль в патологии человека

- *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* sub sp. *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



- Бактерии рода *Prevotella* Гр (-). В мазке представляют собой располагающиеся скоплениями полиморфные палочки размером от 1,5-5 мм в длину и 0,7 мм 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 диаметре. Культуры на глюкозном бульоне мутные, с волокнистым осадком.



Требования к культивированию

- *Облигатные анаэробы. Оптимальная температура роста 37 °C. 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 фимбрий.
 - Липополисахариды:
- гидролазы – цистеиновая протеаза ЛПС-связывающего белка усиливает вирулентность ЛПС.
 - Гемолизин:
- многокомпонентные гемолизины находятся в везикулах наружной мембранны, в комбинации со специфическими фимбриями.
 - Протеазы: сериновая протеаза; дипептидил пептидаза IV; цистеиновая протеаза.

Порфиromонады

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

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

**Порфиromонады или
порфиромонасы**

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



Экология порфиromонад

Виды порфиromонад *Porphyromonas asaccharolytica*, *Porphyromonas endodontalis* и *Porphyromonas gingivalis* обнаруживаются 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

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

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



Порфиromонады

- *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. macasae* — выделены из периодонтальных карманов макак
- *P. pasteri* — выделены из [слюны](#) человека
- *P. pogonae* — выделены из клинических материалов человека
- *P. somerae* — выделены из язв на ноге человека
- *P. uenoponis* — 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.

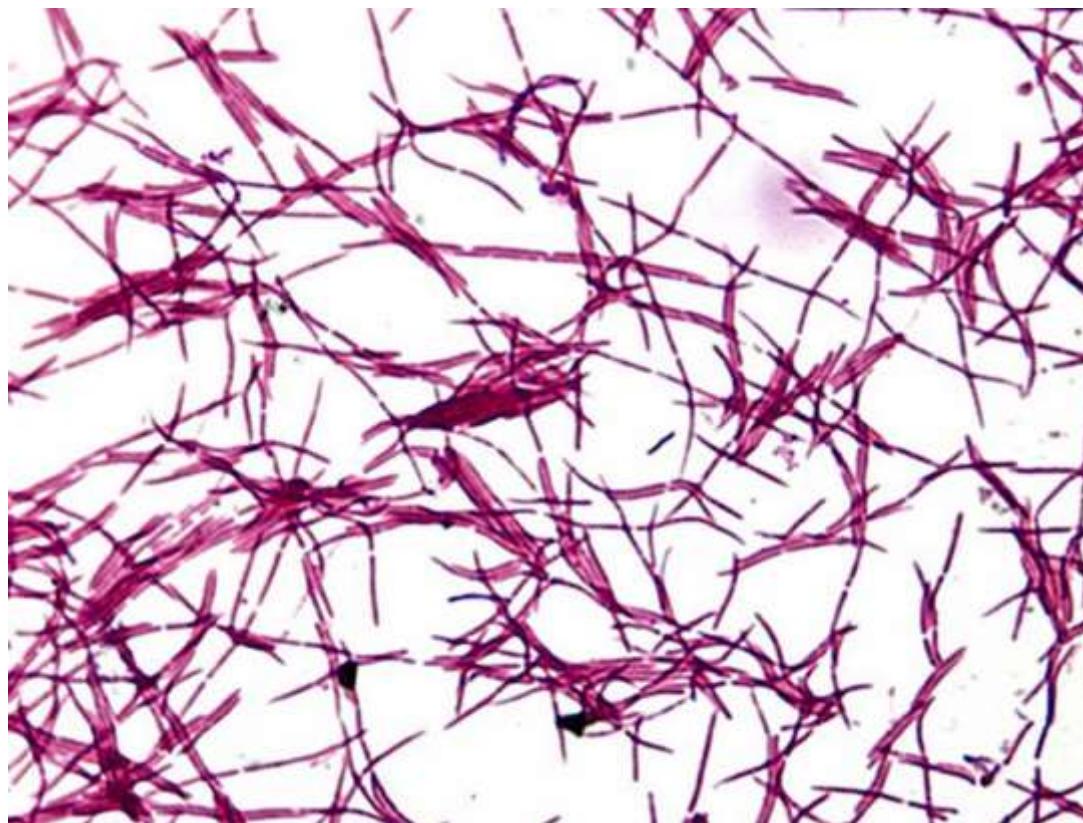
- Один из основных пародонтопатогенных микроорганизмов, способный к инвазии и внутриклеточному паразитизму.
- Основные клинические формы: гингивит, пародонтит, абсцессы и флегмоны, инфекционный эндокардит



Патогенность

- Капсула
- Адгезины
- фимбрии
- Протеазы
- Ивазивность
- 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 $0,5\text{-}3,0 \times 5\text{-}15$ 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 °C.*
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*



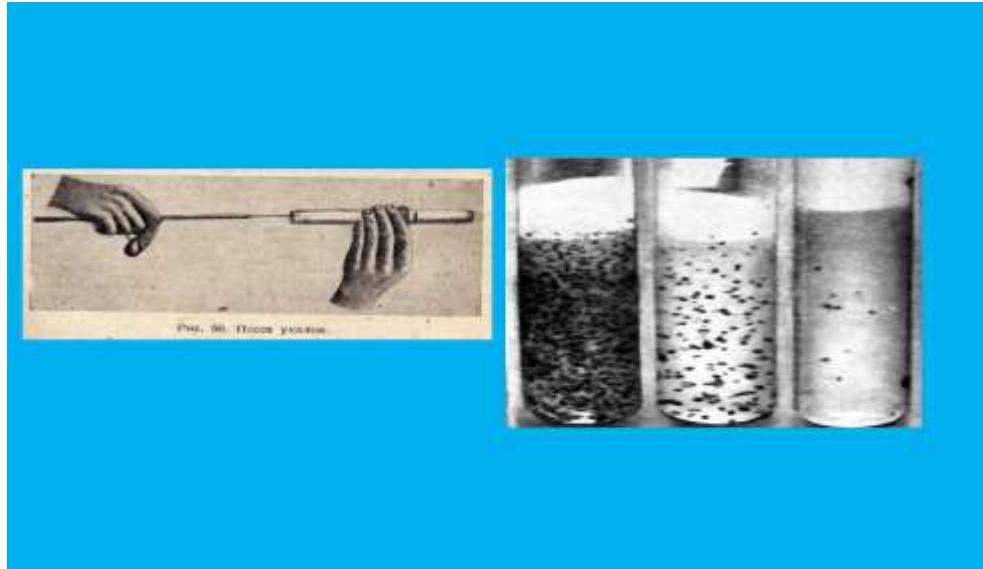
Бактериологический метод

- Выделение чистой культуры осуществляют по методу Цейсслера или Вайнберга
- Культивируют в анаэробных условиях (анаэростаты, 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 (анаэростаты) 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)



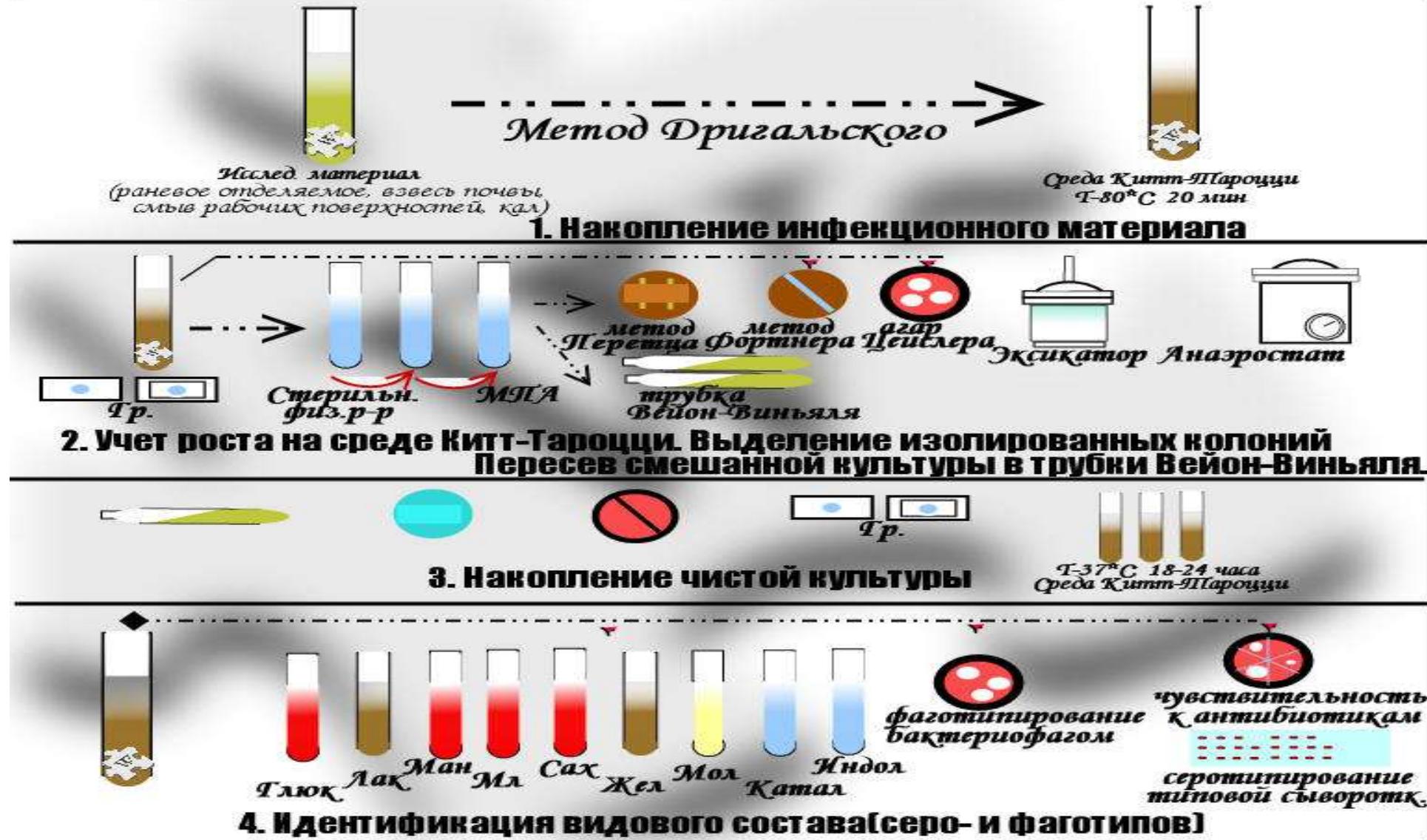
- Возможность создания анаэробной атмосферы (10% CO₂, 80% N₂, 10% H₂)
- Возможность создания собственных параметров атмосферы культивирования

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	Перitoneальная 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 Аппеса с активированным углем, тиогликолевая среда, Кари-Блэйра (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 анаэростате 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 аэротolerантность(отобранный колонии рассеваются 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 - анаэростат 1-4 с.
 - 5% кровяного агара - аэробно

ХАРАКТЕР СВЕЧЕНИЯ В УФ

красное - *Prevotella melaninogenicus*, *Porphyromonas asaccharolyticanaendodontalis*, *Veillonella spp.*, *Clostridium ramosum*

розовое - бактероиды, стрептококки, стафилококки

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



3 этап. Идентификация

ИДЕНТИФИКАЦИЯ

- ✓ Аэротolerантность (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 (клостридию)

- ✓ Гидролиз желатины
- ✓ Лецитовителаза

ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ АНАЭРОБОВ

Индуцибельные ферменты – инкубация в анаэробных условиях

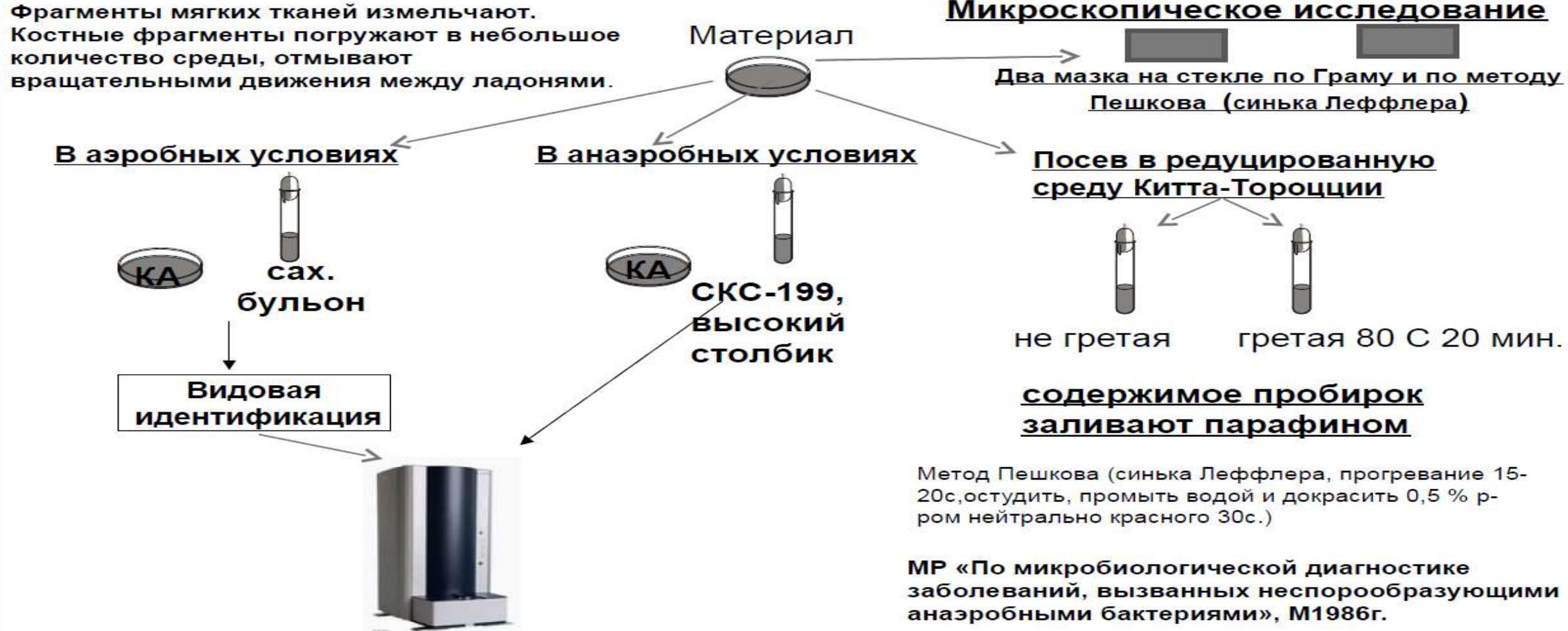
- Анаэротест
- API-20A (биохимические стрипы-тесты, производитель bioMérieux)
- Minitek



Конститутивные (пресинтезированные) ферменты – инкубация в аэробных условиях

- AN-Ident
- RapID-ANA

Схема бактериологического исследования на анаэробы





Экспресс методы

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

Благодарю
за внимание!

