ГБПОУ СК СБМК
ЦМК лабораторной диагностики

СПОРОНЕОБРАЗУЮЩИЕ ГРАМПОЛОЖИТЕЛЬНЫЕ БАКТЕРИИ:

листерии, эризипелотрикс, лактобацилла

преподаватель Ховасова Н.И.

Ставрополь, 2021

Род Lactobacillus

- Семейство Lactobacillaceae, род Lactobacillus - палочковидные бактерии размером 1,0-10х0,5-1,2 мкм. Ж (+/-). Большинство видов неподвижны. При окраске по Граму или метиленовым синим у некоторых штаммов выявляют биполярные тельца, цитоплазматическую зернистость и исчерченность.
- Спор -, Гр + . Факультативные анаэробы.

- Лактобациллы обнаруживают в молочных, зерновых и мясных продуктах, сточных водах, пиве, вине, фруктах и соках, солениях и маринадах.
- Лактобациллы паразитируют в полости рта, кишечном тракте и влагалище многих теплокровных животных и человека, обычно не вызывая развития патологических процессов.

Ферментативные свойства

- Расщепляют углеводы; при сбраживании глюкозы pH снижается на одну единицу и более; не менее половины конечных углеродных метаболитов составляет лактат. Нитраты не восстанавливают, желатину не разжижают, казеин не расщепляют, индол и сероводород не образуют.

Культуральные свойства

- Лактобациллы требовательны к составу питательных сред и нуждаются во внесении в них аминокислот, витаминов, жирных кислот, углеводов и производных нуклеиновых кислот, тиогликолята и цистеина (индивидуальные для каждого вида).
- На КА образуют сероватые S-колонии, окружённые зоной а-гемолиза. Температурный оптимум 30-40 °С; оптимум pH 5,5-5,8. Видовую принадлежность определяют по биохимическим свойствам и способности расти при разных температурах.

Классификация лактобацилл

- Все лактобациллы разделяют по количественному образованию молочной кислоты при ферментации углеводов:
- строго гомоферментативные (85% лактата),
- строго гетероферментативные (50% лактата)
- факультативно-гетероферментативные (около 65-70% лактата) лактобациллы.

Образование газа лактобациллами

- Лактобациллы классифицируют по способности образовывать газ при ферментации глюкозы. Их разделяют на газонеобразующие и газообразующие.
- Газонеобразующие лактобациллы чаще образуют плоские и узорчатые колонии на плотных средах (молочно-печёночный агар с дрожжевым экстрактом); в мазках преимущественно выявляют палочки и нитевидные формы.
- Газообразующие бактерии образуют мягкие вязкие беловатые колонии; в мазках доминируют короткие палочки

Роль лактобацилл

- Лактобациллы используют в пищевой промышленности для получения различных молочнокислых продуктов, хлебобулочных изделий, алкогольных напитков (одновременно они бывают и причиной их порчи).

Роль лактобацилл

- В организме человека лактобациллы — члены микробных сообществ и выделяются с первых месяцев жизни; лактобациллы участвуют:
- в поддержании гомеостаза слизистых оболочек и препятствуют колонизации полостей условно-патогенными микроорганизмами.
- во многих ферментативных процессах организма человека, продуцируют молочную кислоту, аминокислоты, витамины, H_2O_2, лизоцим и другие антибиотические субстанции.

Роль лактобацилл

- У детей лактобациллам принадлежит важная роль в поддержании нормального пищеварения;
- в ЖКТ сбраживают лактозу до молочной кислоты,
- оказывают антисептическое действие
- трансформируют кальций, поступающий с пищей, в усвояемый лактат кальций.
- стимулируют всасывание витаминов и аминокислот;
- усиливают активность лизоцима (за счёт создания кислой среды).

Видовой состав лактобацилл

- Видовой состав лактобацилл в различных отделах ЖКТ и влагалище неодинаков.
- В полости рта обитают Lactobacillus casei, L. acidophilus (палочка Боаса-Опплера), L. fermentum, L. salivarius, L. plantarum, L. brevis и L. buchneri.
- В желудке и тонкой кишке лактобацилл нет или их очень мало (от 0 до $10\text{-}10^4$ в 1 г фекалий).

Видовой состав лактобацилл

- В толстой кишке содержание лактобацилл в 1 г фекалий достигает $10^6 – 10^{10}$ и более; основные виды— Lactobacillus acidophilus, L. plantarum, L. casei, L. fermentum, L. salivarius, L. brevis. Изменения в рационе приводят к варьированию видового состава; растительная диета способствует колонизации лактобацилл, преобладание в рационе мяса подавляет её.

Видовой состав лактобацилл

- Во влагалище лактобациллы идентифицируют как влагалищные палочки, или лактобациллы Дедерляйна; у 80% здоровых женщин их число достигает 105-107/мл; обычно выделяют 5-6 видов— Lactobacillus casei, L. acidophilus, L. fermentum, L. brevis, L. cellobiosus.
- Свойства лактобацилл используют для коррекции дисбактериозов ЖКТ и влагалища, применяя лактобактерин, ацидофилин, «наринэ», пропионовоацидофильное молоко.

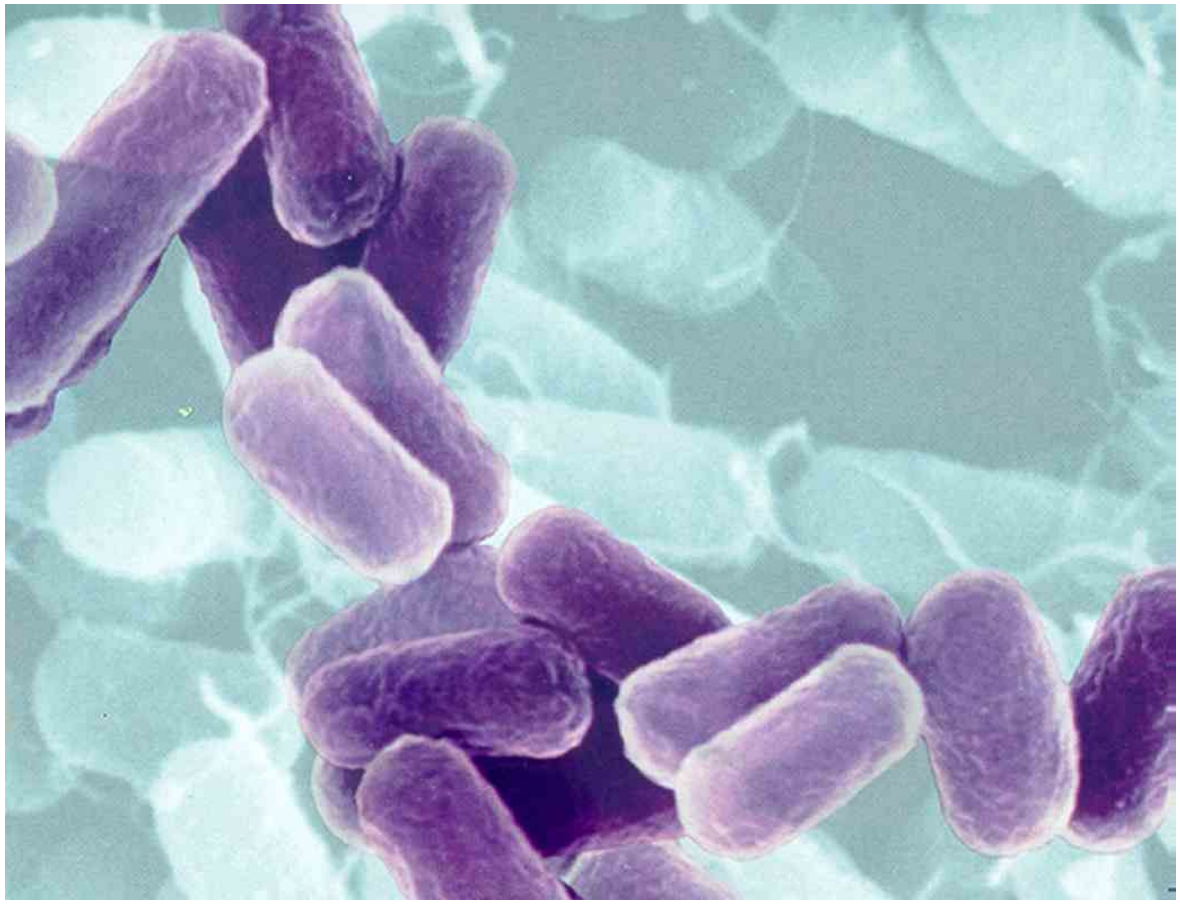
Патогенность лактобацилл

- Лактобациллы практически не проявляют патогенных свойств, но в составе микробных ассоциаций они способны вызывать кариес и последующие эндокардиты (L.plantarum), язвенные вульвиты и гастриты (у пациентов с болезнями злокачественного роста).

Листериоз

инфекционное заболевание человека и животных, вызывается листериями, характеризуется множеством источников инфекции, разнообразием путей и факторов передачи возбудителя, полиморфизмом клинических проявлений, высокой летальностью у новорожденных и лиц с иммунодефицитами.

Листериоз – сапрозоонозная, природно-очаговая, бактериальная инфекционная болезнь. Заболевания у человека вызывает только *Listeria monocytogenes*.



Возбудители листериоза

- Listeria monocytogenes и L.ivanovii - два из шести известных в настоящее время видов бактерий рода Listeria. Девятое издание "Определителя бактерий Берджи" относит род Listeria к 19 группе микроорганизмов - грамположительные неспорообразующие палочки правильной формы.

Морфология

- короткие палочки правильной формы, размерами 0,4-0,5 х 0,5-2 мкм с закругленными концами, иногда почти кокки, одиночные или в коротких цепочках, реже в длинных нитях. Грамположительные, спор и капсул не образуют, некислотоустойчивые. Клетки, выращенные при 20-25 град. С, но не при 35-37 град. С, подвижны за счет перитрихиальных жгутиков.

- Могут превращаться в L-формы и паразитировать внутриклеточно, что обуславливает недостаточную эффективность в ряде случаев антибактериальной терапии, объясняет склонность к затяжному и хроническому течению, возможность латентной формы и бактерионосительства.

- Факультативные анаэробы.
- Хемоорганотрофны, метаболизм бродильного типа; сбраживают глюкозу с образованием в основном L(+) - лактата. Каталазоположительные, оксидазоотрицательные.

УСТОЙЧИВОСТЬ ВО ВНЕШНЕЙ СРЕДЕ

- Листерии высоко устойчивы во внешней среде, растут в широком интервале температур (от 3 до 42 град. С), pH от 5,5 до 9,5, хорошо переносят низкие температуры и способны размножаться при температуре 4-6 град. в почве, воде, на растениях, в органах трупов. В различных пищевых продуктах (молоко, мясо и др.) размножаются при температуре бытового холодильника. При температуре 70 град. С погибают через 20-30 минут, при 100 град. С - через 3-5 минут; инактивируются растворами формалина (0,5%-1%), фенола (5%), хлорной извести (100 мг активного хлора в 1 л).

Эпидемиология

- До недавнего времени листериоз рассматривали как типичный зооноз; источником инфекции считались различные животные и птицы (более 90 видов), в том числе мыши и крысы, кролики, свиньи, коровы, овцы, собаки, кошки, куры и др.
- **Резервуар-** грызуны, зайцы, лемминги, белки, лисицы, норки, еноты, песцы, птицы, мелкий и крупный рогатый скот, лошади, кролики, реже кошки и собаки, также рыба и продукты моря (креветки).

- Сейчас листериоз относят к сапрозоонозам, при которых основным источником и резервуаром возбудителя являются субстраты внешней среды, прежде всего почва. Листерии выделяют также из растений, силоса, пыли, водоемов и сточных вод. Животные заражаются преимущественно через воду и контаминированный листериями корм.

Эпидемиология

- Механизмы инфицирования человека листериями разнообразны.
- Алиментарный - при употреблении различных пищевых продуктов животного и растительного происхождения. Технология приготовления некоторых продуктов такова, что велика опасность контаминирования их листериями и дальнейшего размножения микробов до высоких концентраций (в том числе при хранении в холодильнике).

- Описанные неоднократно вспышки листериоза были связаны с употреблением мягких сыров, мясных полуфабрикатов, колбасных изделий в вакуумной упаковке, салатов и т.д. Заражение возможно при употреблении некипяченого молока, мороженого, тортов, куриных и рыбных изделий. В настоящее время листериоз рассматривается как пищевая инфекция.

Эпидемиология

- контактный путь заражения (от инфицированных животных и грызунов)
- аэрогенный (в помещениях при обработке шкур, шерсти, а также в больницах)
- трансмиссивный (при укусах насекомыми, в частности клещами), половой.
- особое значение имеет передача листериоза от беременной женщины плоду (трансплацентарно). Листерии могут быть причиной внутрибольничной инфекции, в частности в роддомах.

- Листерии не являются высокопатогенными микробами, они вызывают клинически манифестное заболевание у человека лишь при ослаблении у него факторов иммунной защиты.
- Листерии относятся к факультативным внутриклеточным паразитам

- Листериоз относят к оппортунистическим инфекциям, наибольшему риску заболевания подвергаются лица с различными иммунодефицитами (беременные, новорожденные, лица пожилого и старческого возраста, ВИЧ-инфицированные, онкологические больные, пациенты с сахарным диабетом, почечной или сердечной недостаточностью, хронической алкогольной интоксикацией и т.д.)

КЛИНИКА

- Продолжительность инкубационного периода составляет 2-4 недели, реже до 1,5-2 месяцев.
- Клинические проявления листериоза многообразны в зависимости от пути проникновения микроба в организм человека, реакции иммунной системы и целого ряда других кофакторов (возраст, пол, сопутствующие заболевания и т.д.).
- Основные формы листериоза: железистая, нервная и септическая. Отдельно выделяют листериоз беременных и новорожденных. В зависимости от продолжительности заболевания различают острый, подострый и хронический листериоз.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА.

- Установить диагноз листериоза по клинико-эпидемиологическим данным трудно из-за полиморфизма клинических проявлений и невозможности в ряде случаев установить источник инфекции.
- Листерии могут быть выделены от больных из различных биологических субстратов: крови, цереброспинальной жидкости (ЦСЖ), мазков с миндалин, пунктатов лимфатических узлов, мазков из влагалища и цервикального канала, фекалий, гнойного отделяемого из глаз и т.д.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

- При подозрении на листериозный сепсис производят посев крови, при менингите и менингоэнцефалите - СМЖ, при заболевании новорожденных - меконий. От женщины, родившей мертвого или с признаками листериоза ребенка, исследуют околоплодную жидкость, плаценту, отделяемое родовых путей.
- Кроме того, возможно выделение листерий в мазках из ротоглотки и из фекалий здоровых людей, что расценивается как бессимптомное носительство.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

- Стерильные биологические жидкости (СМЖ, амниотическая жидкость) и биоптаты тканей доставляют в лабораторию в течение 2 часов при 35 град. С в стерильных пробирках или контейнерах с герметическими крышками. Образцы крови - в коммерческих или приготовленных в лаборатории флаконах для гемокультур.

- Мазки из нестерильных полостей тела человека (заднего свода вагины, цервикального канала, ротоглотки) доставляют в лабораторию в транспортных средах Amies или Stuart в соответствии с рекомендациями фирм производителей. Меконий и фекалии в контейнерах с герметическими крышками при 4 град. С в течение 48 часов.

МИКРОСКОПИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Предварительный лабораторный диагноз некоторых клинических форм листериоза может быть поставлен на основании результатов бактериоскопического исследования окрашенных по Граму мазков осадка ЦСЖ и амниотической жидкости. Однако, клетки Listeria spp. в окрашенных по Граму мазках СМЖ следует дифференцировать с клетками стрептококков, коринебактерий , Haemophilus influenzae.

МИКРОСКОПИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Морфология клеток Listeria spp. в окрашенных по Граму мазках культур в значительной степени зависит от условий культивирования. В мазках культур, выращенных на плотных питательных средах, клетки Listeria spp. выглядят как грамположительные кокки и коккобациллы. В мазках бульонных культур - как короткие палочковидные бактерии, иногда похожие на клетки коринебактерий.

БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

- Для выделения клинически значимых видов Listeria spp. из стерильных биологических жидкостей (СМЖ, кровь, амниотическая жидкость) и биоптатов тканей не требуется специальных сред или условий культивирования.
- При первичном посеве Listeria spp. хорошо растут на кровяном агаре, шоколадном агаре, рекомендованном для бактериологического анализа СМЖ, в бульоне на основе сердечно-мозгового настоя, тиогликолевом бульоне, в коммерческих флаконах для гемокультур, триптозном бульоне с глюкозой.

БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

- Засеянные жидкие питательные среды инкубируют при 35 град. С в течение 5-7 дней; высевы на кровяной агар проводят в случае видимого роста.
- На поверхности плотных сред образуют мелкие блестящие колонии с перламутровым оттенком (S-формы) и беловатые плоские (R-формы). Культура на твердой пит.среде имеет запах творога.

- При бактериологическом анализе крови проводят слепые высевы на кровяной агар. На кровяном агаре колонии клинически значимых видов Listeria spp. вырастают в течение 1-2 дней инкубации при 35 град. С.

- Колонии клинически значимых видов Listeria spp. на кровяном агаре маленькие (<= 1 мм в диаметре), сферические, гладкие, полупрозрачные, зона бета-гемолиза узкая. Бета-гемолиз лучше виден при удалении колонии с поверхности агара.

БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

- Может быть проведено холодовое обогащение при 4 град. С в триптозном бульоне с глюкозой или том же бульоне с тиоционатом калия (конечная концентрация 3,75%). Но так как холодовое обогащение продолжается от 2 до 6 месяцев, то не всегда результаты такого исследования могут иметь клиническое значение.

УСКОРЕННЫЕ МЕТОДЫ ОБНАРУЖЕНИЯ

- В качестве ускоренных методов обнаружения в клиническом материале клинически значимых видов Listeria spp. могут быть рекомендованы - РИФ, ИФА, ПЦР

СЕРОДИАГНОСТИКА ЛИСТЕРИОЗА

- Методы серодиагностики листериоза детально не разработаны. При определении специфических антител доступными в настоящее время методами имеют место как ложноотрицательные, так и ложно-положительные результаты исследований.
- У иммунонекомпетентных лиц высокие титры специфических антител класса IgM могут наблюдаться в течение нескольких лет.

Род Erysipelothrix

- Род Erysipelothrix — прямые или слегка изогнутые палочковидные бактерии (0,8-2,5 □0,2-0,4 мкм), имеющие тенденцию образовывать длинные нити длиной до 60 и более мкм; последние могут утолщаться и содержать гранулы. Неподвижны, спор и капсул не образуют; хемоорганотрофы; грамположительны, но в старых культурах могут изменять отношение к окраске по Граму.

- Факультативные анаэробы; каталазоотрицательны; ферментативная активность слабая — ферментируют глюкозу и некоторые углеводы с образованием кислоты; на кровяных средах дают -гемолиз.
- Широко распространены в природе, паразиты рыб и теплокровных.

Таксономические свойства

- Типовой вид — Erysipelothrix rhusiopathiae; Такахаши с соавт. (Takahashi et. al., 1987) описали второй вид — E. tonsillarum, отличающийся от первого лишь степенью гомологии ДНК. Все штаммы данного вида принадлежат к одному серовару и маловирулентны для свиней. Erysipelothrix rhusiopathiae открыли Пастер и Тюилье (1882), Леффлер (1886) как возбудитель рожи свиней и Розенбах (1884) как возбудитель ползучей эритемы Бейкера или эризипелоида. Идентичность обоих микроорганизмов установил Вилявин (1955).

Распространение

Erysipelothrix rhusiopathiae устойчив во внешней среде и распространен повсеместно; на разлагающихся органических субстратах может сохраняться месяцами, а в трупах — до года. При высушивании погибает в течение 3 недель, на прямом солнечном свету — за 12 суток; кипячение убивает его в течение 3-5 минут. Неустойчив к действию дезинфектантов.

- Резервуар — грызуны, насекомоядные и домашние животные, включая птиц (куры, утки, индейки, голуби и др.). Эризипелоид животных — природно-очаговая нетрансмиссивная инфекция; возбудитель может сапрофитировать на различных сортах мяса и рыбы, человек заражается контактным путем, а заболеваемость носит выраженный профессиональный или бытовой характер. В группу риска относят рыбаков, лесорубов, работников боен, ветеринаров и т.д.

Морфология и культуральные свойства

- Грамположительная мелкая палочка, часто образующая нитевидные формы; в мазках обычно располагается парами, реже одиночно. Хорошо растет на простых слабощелочных средах; оптимальная среда для культивирования — сахарный бульон; через 10-15 ч отмечают помутнение, через 40-48 ч образуется белый осадок. Растет в температурных пределах 16-41°С, наиболее быстро при температуре 37°С, но наибольший выход клеток получают после культивирования при 33°С. Через 24-48 ч рост скудный, в виде мелких, трудно различимых S-колоний; его несколько усиливает добавление глюкозы и сыворотки.

- Переход в авирулентные R-формы наблюдают при длительном культивировании на искусственных средах.
- Нитраты не восстанавливает, эскулин не гидролизует; не ферментирует мальтозу, маннит, рамнозу, глицерин, салицин.
- Выделяют два варианта возбудителя — suis (свиной) и murisepticum (мышиный);
- На желатине через несколько суток культивирования образует тонкие нити, перпендикулярные линии укола, что придает культуре вид ершика для мытья посуды.

Антигенная структура

- По антигенной формуле бактерии данного вида разделяются на три группы: F, B, N. Общим видовым антигеном является антиген N. Антиген B обладает протективными свойствами. От больных свиней чаще всего выделяют штаммы серовариантa A.

- возбудитель проникает через кожу при ее травматизации; реже наблюдают проникновение через слизистую оболочку зева и ЖКТ. Возникновению заболевания способствуют мацерация и длительное охлаждение кожи. Инкубационный период не превышает 1-2 суток.
- В месте проникновения возбудителя (возникают ограниченные эритематозные темно-красные или розовато-синюшные пятна диаметром от 1 до 5-10 см. Для очагов характерен эксцентрический рост; по мере роста центр поражений бледнеет, а периферия остается ярко окрашенной; эритема быстро растет (в среднем на 1 см/сут), более выраженно продвигаясь в проксимальном направлении.

Клинические проявления

- У больных возникают отеки и болезненность суставов; в процесс вовлечены регионарные лимфатические узлы. Для заболевания характерно быстрое течение (обычно не более 2 недель), но артралгии и артропатии могут продолжаться дольше и часто рецидивируют.
- Перенесенное заболевание не вызывает развития стойкого иммунитета, возможны случаи повторного заражения. При нарушениях иммунитета либо при заражении большой дозой возбудитель может лимфо- и гематогенно диссеминировать в различные органы, вызывая метастазирующий сепсис, пневмонии, менингоэнцефалиты, и приводить к гибели больного.

Лабораторная диагностика

- кусочек измененной кожи засевают на обычные питательные среды (рост в виде мелких колоний наблюдают через 18-24 ч при 37°С) с последующей микроскопией выросших колоний. Существенный признак — способность Erysipelothrix rhusiopathiae образовывать H_2S и вызывать почернение среды Олькеницкого, что нехарактерно для большинства грамположительных палочек.

- При генерализованных формах проводят бактериологическое исследование крови (дополнительно при секции — печени, селезенки, увеличенных лимфатических узлов) и ставят биологическую пробу с белыми мышами, иммуносупрессированными кортизоном (4-5 мг в/м за 4 ч до подкожного заражения). Мыши погибают через 3-5 суток, и из органов легко выделить возбудитель.

Питательные среды для культивирования E. rhusiopathiae

Для выделения культур используют питательные среды с 5—10% сывороткой крови и 0,2—0,5% глюкозы. При исследовании материала, контаминированного посторонней микрофлорой, используют селективные средами.

^ **Селективная среда ESB.** В 1000 мл стерильного питательного бульона вносят 50 мл сыворотки крови лошади, 400 мг канамицина, 50 мг неомицина, 25 мг ванкомицина. Среда пригодна для использования в течение 12—14 дней, хранение при 4°С.

^ **Селективная среда MBA.** В 1000 мл питательного агара добавляют 0,4 г азида натрия. Стерилизуют при 121°С 15 минут и асептически вносят 50 мл сыворотки крови и 20 мл крови лошади.