СПбГПМУ

Кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии

Занятие 14

ПАТОГЕННЫЕ СПОРОВЫЕ АНАЭРОБЫ: ВОЗБУДИТЕЛИ СТОЛБНЯКА, ГАЗОВОЙ ГАНГРЕНЫ, БОТУЛИЗМА. НЕСПОРООБРАЗУЮЩИЕ АНАЭРОБЫ: БАКТЕРОИДЫ, ФУЗОБАКТЕРИИ.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ:

1. Общая характеристика патогенных споровых анаэробов (клостридии): возбудителей столбняка, газовой гангрены, ботулизма.

2. Общая характеристика неклостридиальных анаэробных инфекций: бактероиды, фузобактерии. Особенности химиотерапии неклостридиальных анаэробных инфекций.

3. Принципы микробиологической диагностики при анаэробных инфекциях.

4. Специфическая профилактика и терапия столбняка, газовой гангрены.

Таксономия

Family. *Clostridiaceae*

Genus. *Clostridium*

Species. *C.perfringens, C.novi, C.septicum, C.histolyticum; C.tetani; C.botulinum; C.difficile.*

Возбудители газовой гангрены

	Морфологические, тинкториальные свойства	Подвижность	Капсуло-бразование	Анаэробность
C.perfrin-gens	крупная грамположи-тельная палочка	Нет жгутиков	In vivo образует капсулу	Умеренный облигатный анаэроб
C.novyi	крупная грамположи-тельная палочка	Перитрих	Нет капсулы	Строгий облигатный анаэроб
C.septicum	крупная грамположи-тельная палочка	Перитрих	Нет капсулы	Строгий облигатный анаэроб
C.histolyti-cum	крупная грамположи-тельная палочка	Перитрих	Нет капсулы	Умеренный облигатный анаэроб
C.sordellii	крупная грамположи-тельная палочка	Перитрих	Нет капсулы	Умеренный облигатный анаэроб

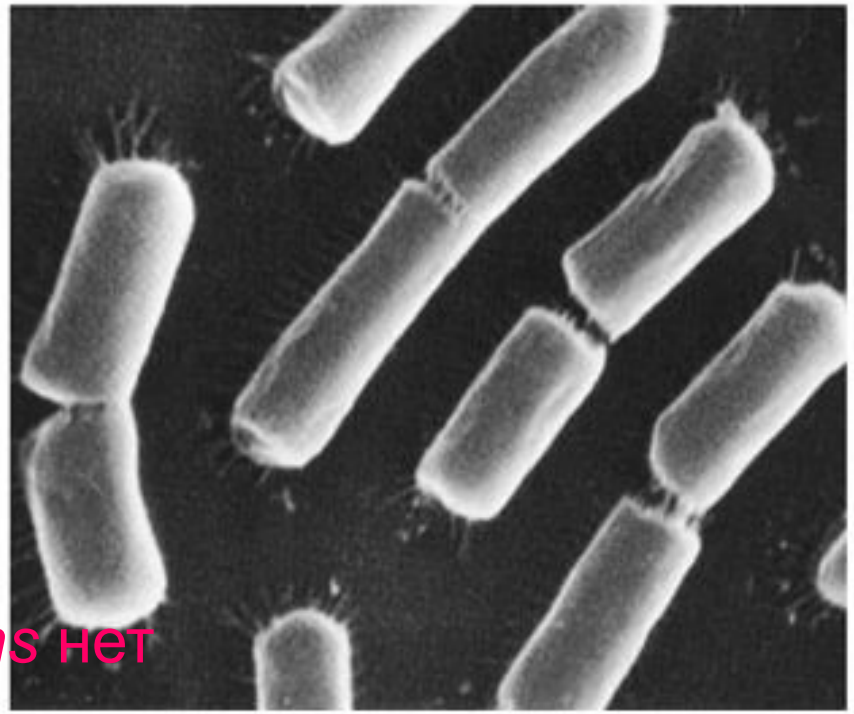
Морфология

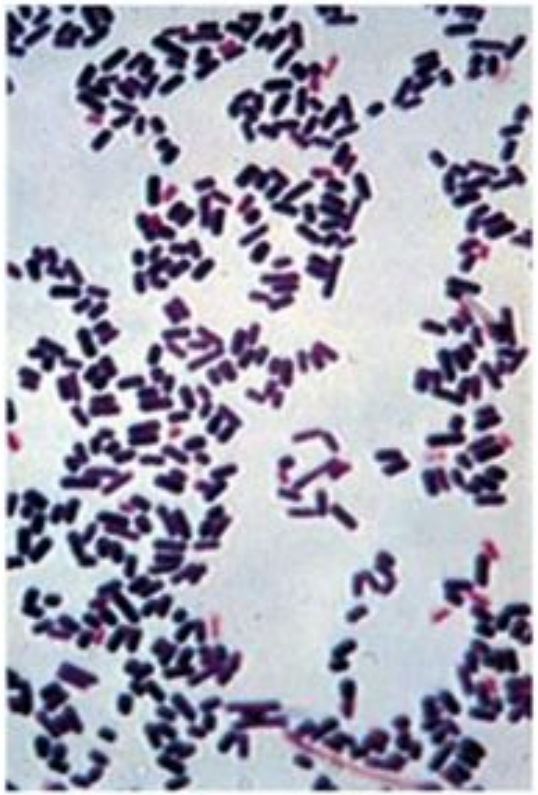
Полиморфные грамположительные палочки;

овальные крупные споры;

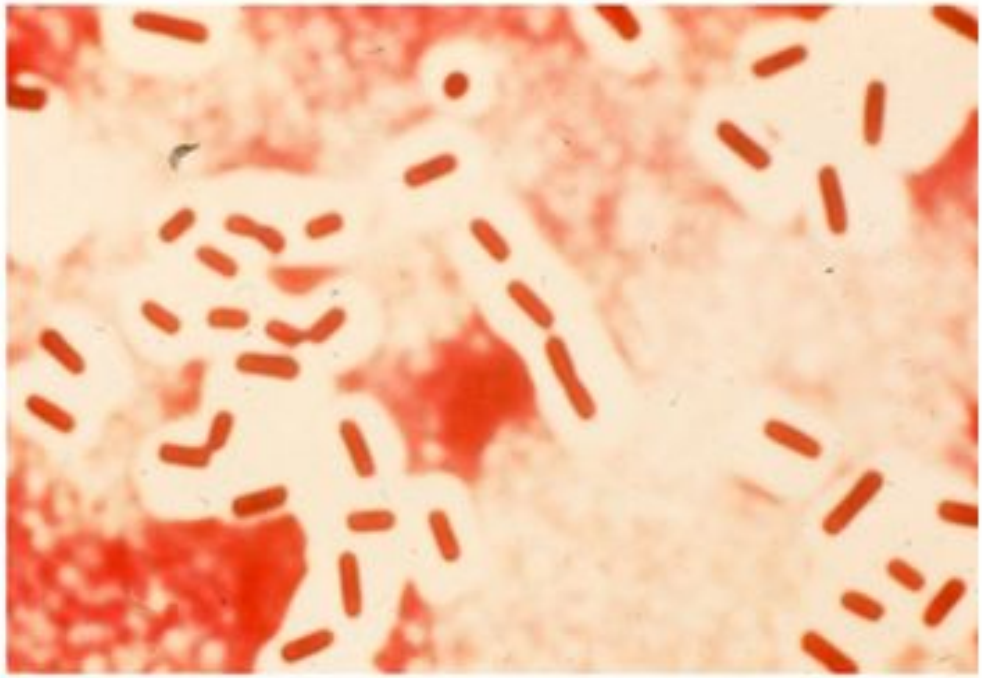
C.perfringens – капсула;

Жгутики. - у *C.perfringens* нет



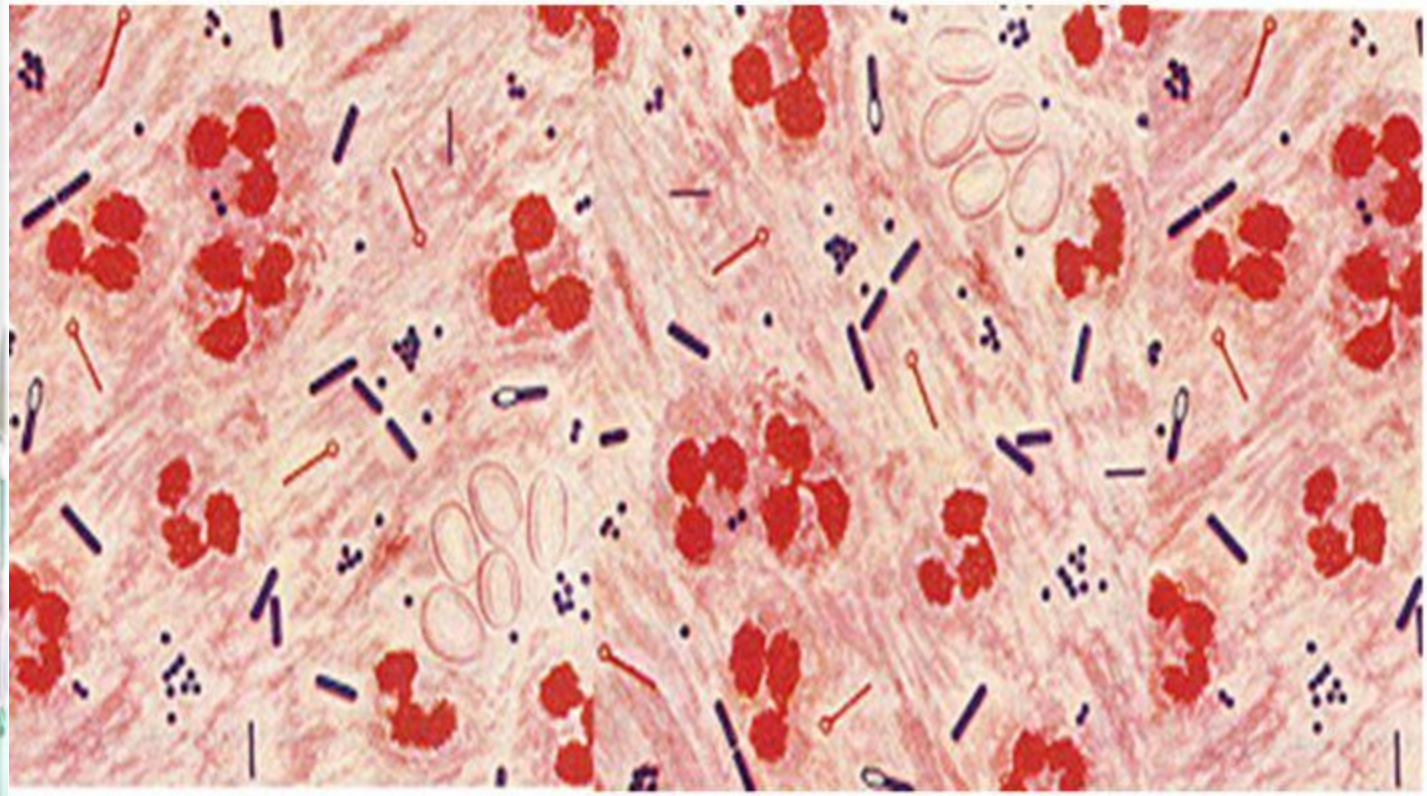


C.perfringens (чистая культура) окраска по Граму



C.perfringens – окраска по Бурри-Гинсу (вокруг красных палочек видна бесцветная капсула на фоне туши)

MyShared

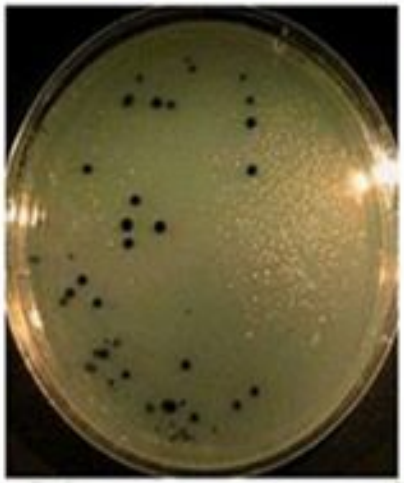


Мазок изгноя при смешанной анаэробной инфекции. Видны как минимум 3 разные клостридии.

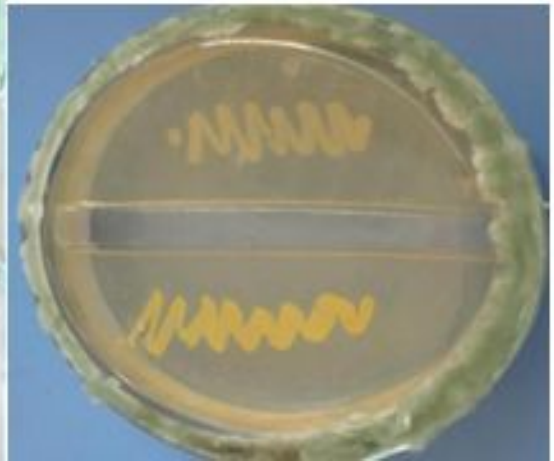
MyShared

Cl.perfringens культуральные свойства

- Растут на средах с низким окислительно-восстановительным потенциалом: клостридиум агар , среда Вильсон-Блэр , железосульфитное молоко



Рост на железо-сульфитном агаре



Культуральные свойства

Облигатные анаэробы;

R и S-колонии;

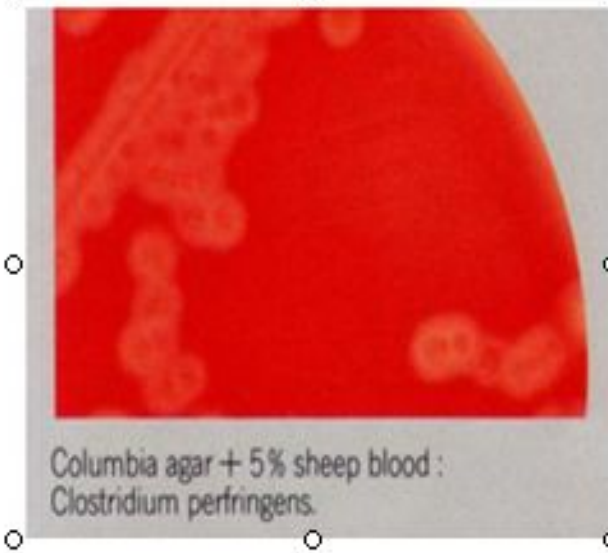
гемолиз;

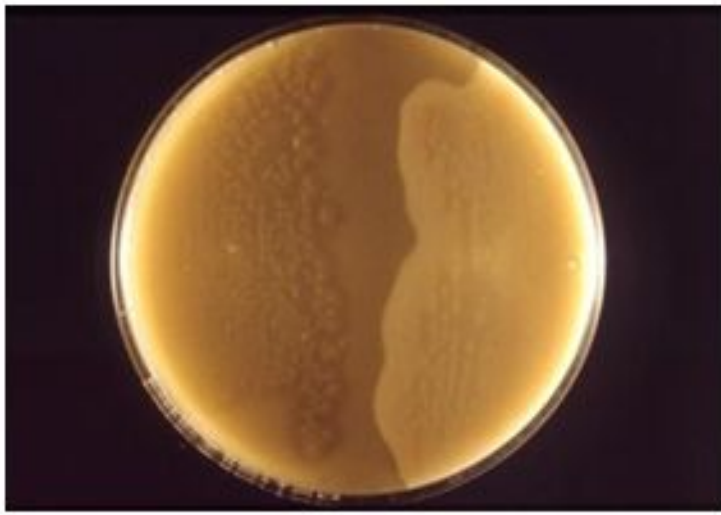
ЖСА – лецитиназа;

среда Вильсон-Блера;

бурное газообразование;

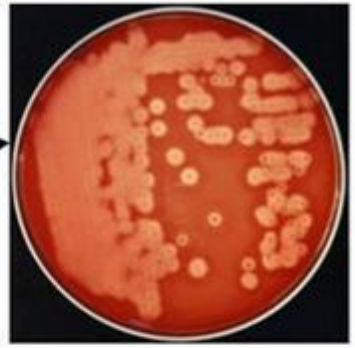
Высокая гликолитическая, слабая протеолитическая активность.

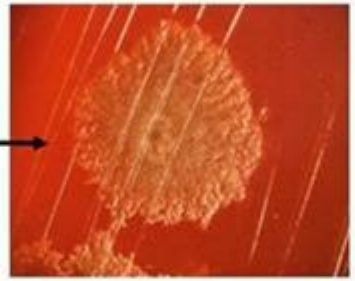


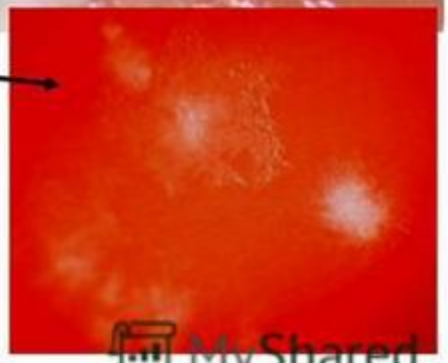


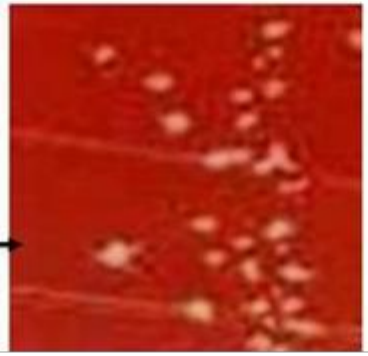
Differentiation of Clostridia due to culture properties

- Sugar-blood agar:
  - C. perfringens
  - C. novyi
  - C. septicum
  - C. histolyticum

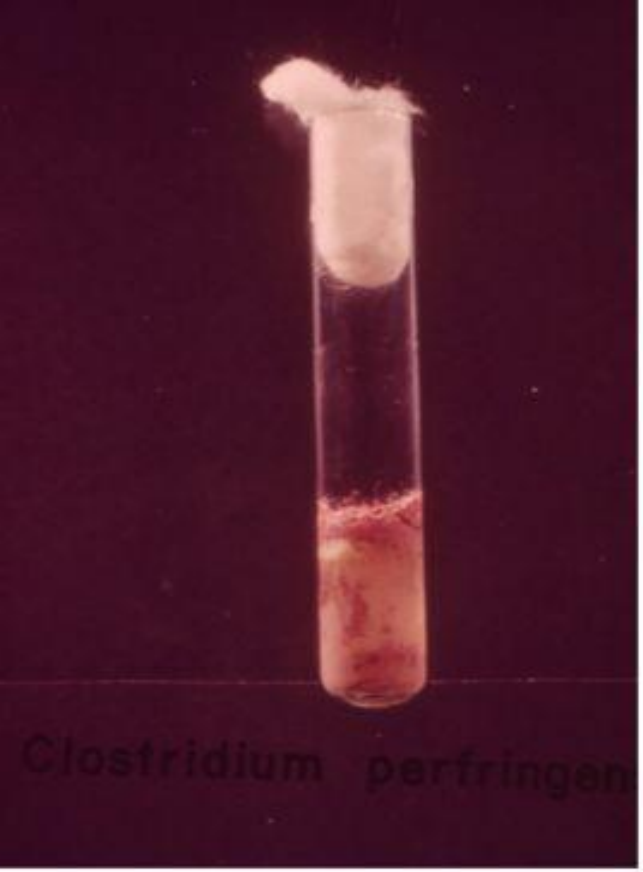






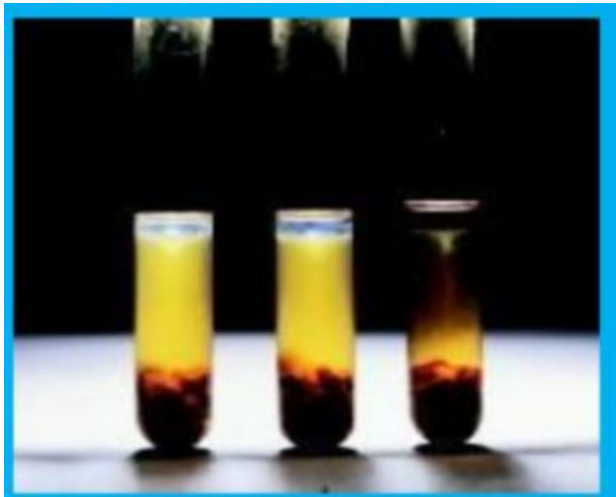


MyShared



Клостридии створаживают молоко

Виден разрыв столбика агара за счет образования большого количества газа



Среда Китта- Тароцци

- *Тип дыхания:* облигатные анаэробы;
- *Биохимически активны*: расщепляют углеводы с образованием большого количества газа, высокая протеолитическая активность; масляно-кислое брожение
- *Антигены*: по антигенной специфичности продуцируемых токсинов выделяют 5 серотипов *C.perfringens* от А до Е; тип А чаще вызывает газовую гангрену, А,С, Д,Е вызывают пищевые токсикоинфекции

Факторы патогенности

- Бета – токсин – обуславливает очаговый отек, геморрагии и сегментарный кишечный некроз (гангрена кишечника)
- Эпсилон – токсин – увеличивает сосудистую проницаемость слизистой кишечника
- Иота – токсин –летальный токсин, вызывает некроз и повышает проницаемость сосудов.
- Энтеротоксин – пищевые токсикоинфекции

Факторы патогенности

«Малые» токсины

Дельта – токсин – гемолитическая активность

Тета – токсин – разрушает холестерин клеточных мембран, приводит кцитолизу

Каппа– токсин (коллагеназа,желатиназа) – некротическое действие

Лямбда - токсин – протеаза

Гиалуронидаза

ДНКаза

Нейраминидаза – модифицирует рецепторы на клетках

«Малые» токсины усиливают действие альфа - токсина

MyShared

Эпидемиология возбудителя газовой гангрены.

- Clostridium perfringens распространены повсеместно; бактерии выделяют из воды, почвы и сточных вод. Также они колонизируют кишечник животных и человека (выделяют у 25-35% здоровых лиц). У человека возбудитель газовой гангрены вызывает два типа поражений — газовую гангрену и пищевые токсикоинфекции.

Патогенез

- Газовая гангрена - анаэробная раневая инфекция. обычно развивается после тяжелых проникающих ранений , сопровождающихся нарушением кровоснабжения и загрязнением раны землей; причинами газовой гангрены могут быть хирургические операции и в/м инъекции.
- В месте повреждения размножение клостридий вызывает некроз тканей, усиливающийся распад ткани создает все более благоприятные условия для анаэробных палочек; процесс постоянно интенсифицируется. В кровь попадают токсины и продукты распада тканей – общая интоксикация.

Клиника

- Газовая гангрена имеет короткий инкубационный период - почти всегда менее 3 сут и часто менее 24 ч..
- Первые симптомы – сильная боль и набухание тканей вокруг раны
- Отек и интоксикация быстро нарастают. Отделяемое становится обильным , приобретает характерный сладковатый запах .
- Во время хирургической обработки мышцы могут казаться бледными из-за выраженного отека, однако они не сокращаются при пересечении скальпелем . На разрезе мышцы имеют вид вареного мяса и не кровоточат . В дальнейшем они становятся черными и рыхлыми
- Крепитация (похрустывание при пальпации – результат обильного газообразования) нередко определяется по всей поверхности тела.
- Сознание длительное время остается ясным, несмотря на артериальную гипотонию и почечную недостаточность . Спутанность сознания и кома наступают только перед смертью

MyShared

Gas gangrene

Лабораторная диагностика

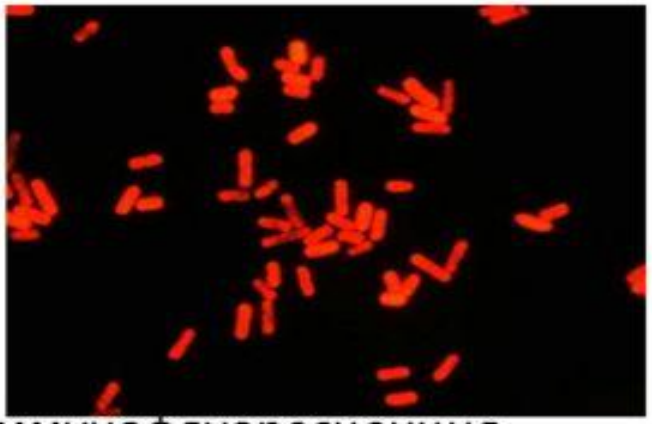
Материалом для исследований служат биоптаты поражённых тканей (включая участки, примыкающие к очагам некроза, и отёчную жидкость), перевязочный и шовный материал, одежда, образцы почвы. Транспорт клинического экземпляра производится строго в анаэробных условиях

Методы:

1. Быстрая диагностика:

иммунофлуоресцентный;

клинический диагноз подтверждается при обнаружении грамположительных палочек в отсутствии лейкоцитов



Иммунофлуоресценция Клостридии

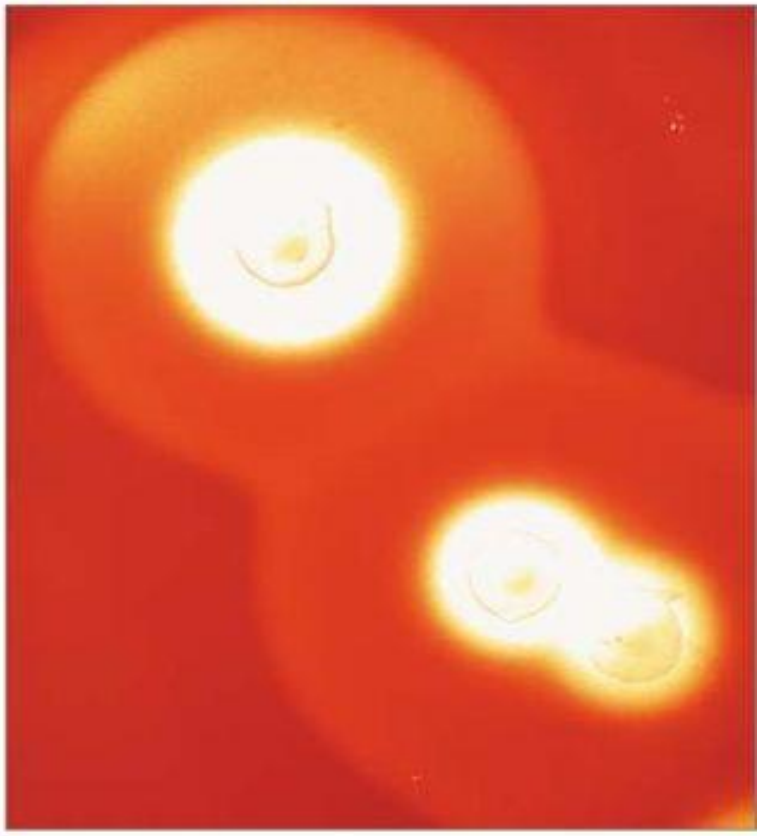
MyShared

Лабораторная диагностика

2. Бактериологический метод

1 этап. Посев на элективные питательные среды (предварительное прогревание уничтожит неспоровые бактерии)

2 этап. Макро- и микроскопическое изучение колоний.



Двойная зона гемолиза при росте Clostridium perfringens на Columbia agar

Лабораторная диагностика

2. Бактериологический метод

3 этап. Биохимическая идентификация на системах API-20A

3. Биопроба на мышах – реакция нейтрализации токсина антитоксином

Лечение и профилактика

Профилактика: обработка ран, асептика и антисептика.
Специфическая профилактика – анатоксин *C.perfringens* и*C.novi* в составе секстанатоксина.

Лечение и экстренная профилактика – антитоксическая поливалентная сыворотка или иммуноглобулин. Вводят дробно по Безредко.

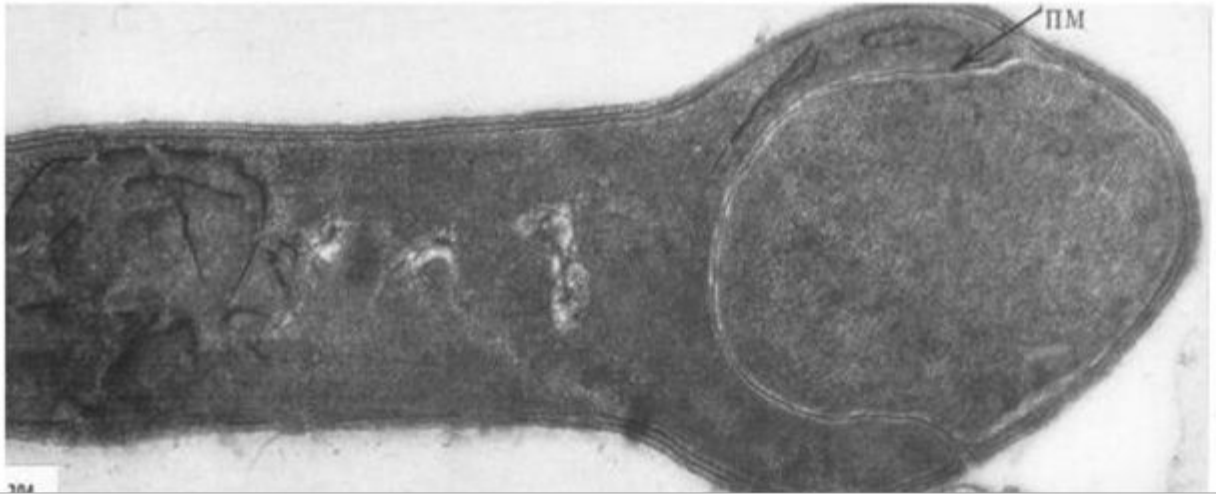
Лечение хирургическое: удаляют некротические ткани.

Для этиотропного лечения применяют антибиотики (бета-лактамы,аминогликозиды).

Возбудитель столбняка

Clostridium tetani

Столбняк – тяжелое нейротоксическое заболевание, характеризующееся судорожным синдромом: болезненное сокращение мышц (тетанус), длительное напряжение мышц (мышечная регидность).



Морфология

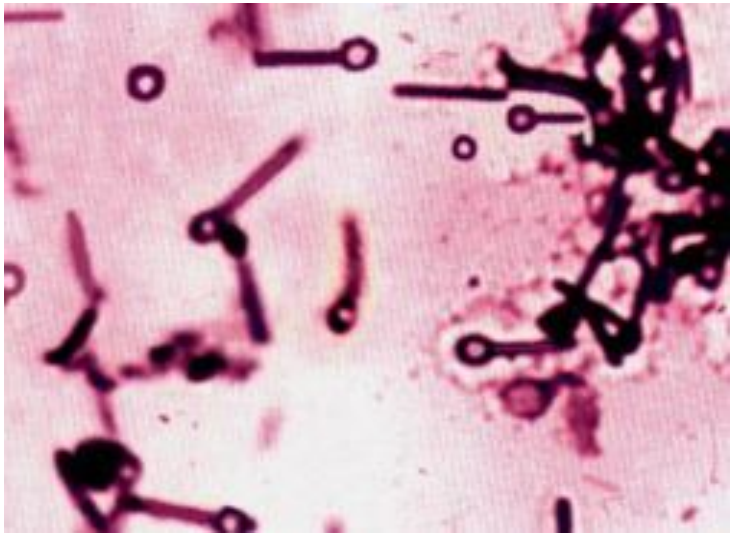
крупные прямые палочки;

перитрихи;

капсулу не образуют;

споры расположены терминально (барабанная палочка);

грамположительны, но в культуре старше 24 ч становятся грамотрицательными.



КУЛЬТИВИРОВАНИЕ

C.tetani – облигатный анаэроб;

культивируют на среде КиттаТароцци, сахарном кровяном агаре;

на жидких средах – придонный рост;

на плотных – прозрачные или сероватые колонии с шероховатой поверхностью;

на кровяном агаре – гемолиз;

углеводы не ферментируют, не образуют индола, восстанавливают нитраты, медленно свертывают молоко, разжижают желатину.

Colonies of Clostridium tetani

Резистентность возбудителя столбняка

- Вегетативная форма бактерий столбняка мало устойчива к воздействию температуры и химических агентов, тогда как их споры обладают значительной устойчивостью.
- Во влажной среде споры выдерживают нагревание до 80 °С в течение 4 - 6 ч и более, при кипячении они погибают через 40-50 мин.
- В сухом состоянии споры переносят еще более высокие температуры, нагревание при 115 °С разрушает их только через 20 мин, споры совершенно не чувствительны к низким температурам. Они годами переносят температуру 40-60 °С,

Антигенная структура

О-АГ– видоспецифический;

Н-АГ– типоспецифический, выделяют около 10 сероваров;

два растворимых АГ – тетанолизин и тетаноспазмин.

Патогенность

Тетаноспазмин – функциональный блокатор, способный соединяться с рецепторами нейронов, прямое влияние на процесс передачи нервных импульсов в головном и спинном мозге.

Тетанолизин – мембранотоксин, вызывает гемолиз эритроцитов.

ПАТОГЕНЕЗ

Источник – животные.
Механизм передачи – контактный.
Путь передачи – прямой контакт.
Входные ворота – поврежденная кожа и слизистых оболочки; ранения, ожоги, обморожения, операционные раны, после инъекций; после родов, у новорожденных («пупочный столбняк» – летальность до 90%);
фазы: бактериальная и токсическая;
токсин распространяется по кровеносным и лимфатическим сосудам, по нервным стволам, и поражает нервные окончания синапсов;

Тризм

«Сардоническая улыбка»

Патогенез

Нисходящий тип: тонические сокращения жевательных и мимических мышц, затрудненное глотание, затем тоническое сокращение и спазм мышц затылка, спины, груди и живота. Опистотонус.

Смерть наступает от асфиксии и поражения жизненно важных нервных центров. Летальность 45-50%.

На фото опистонус у ребенка.

Микробиологическая диагностика

У больных не проводится вследствие выраженности клинической картины. Микробиологические исследования лишь подтверждают диагноз.

Материал: раневое отделяемое, кровь.

1. Экспресс метод- РИФ.
2. Обнаружение токсина –РНГА.
3. Биопроба на животных- реакция нейтрализации.

Лечение и профилактика

Профилактика – столбнячный анатоксин (АКДС, АДС, АС).
Для лечения столбняка применяются противостолбнячный иммуноглобулин, при отсутствии – антитоксическая сыворотка.

Вакцина коклюшно-дифтерийно-столбнячн адсорбированная жидкая - АКДС

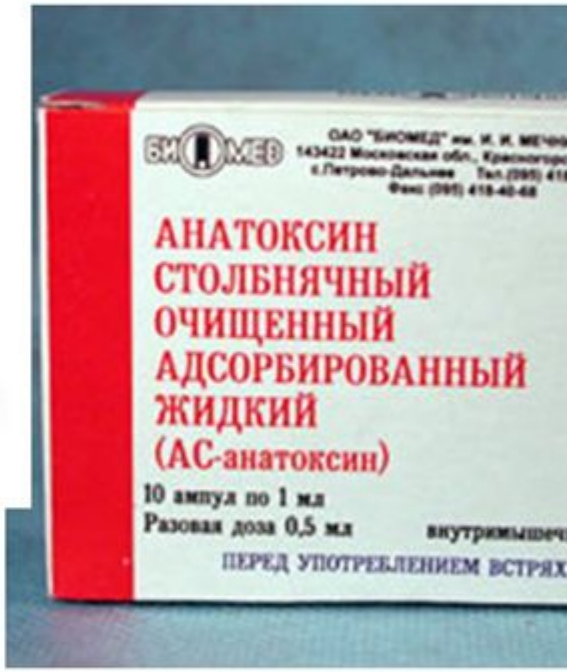


Схема вакцинации:

- *профилактика дифтерии, коклюша, столбняка в соответствии с Национальным календарем профилактических прививок РФ*
- *трехкратно с интервалом 1,5 месяца (3 мес - 4,5 мес - 6 мес)*
- *ревакцинация в 18 месяцев*

Экстренная профилактика

Показания:

травмы;

обморожения и ожоги;

внебольничные аборты;

роды вне медицинских учреждений;

укусы животными;

проникающие повреждения ЖКТ.

Столбнячный анатоксин (у ранее иммунизированных против столбняка) или столбнячный анатоксин + противостолбнячный иммуноглобулин человека (у непривитых против столбняка), при его отсутствии – противостолбнячная сыворотка.

Саногенез

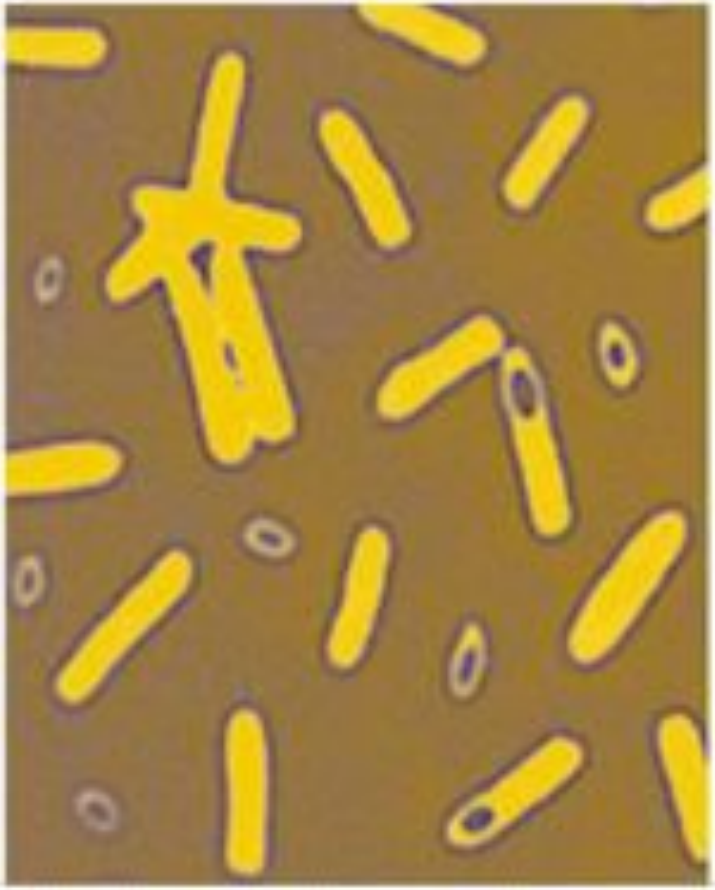
Иммунитет не вырабатывается, хотя тетаноспазмин обладает выраженной иммуногенной активностью (быстрое проникновение в нейроны).

От матери, вакцинированной от столбняка, новорожденным передается непродолжительный пассивный антитоксический иммунитет.

Возбудитель ботулизма

Clostridium botulinum

Ботулизм – острое инфекционное заболевание, характеризующееся интоксикацией организма с преимущественным поражением ЦНС.



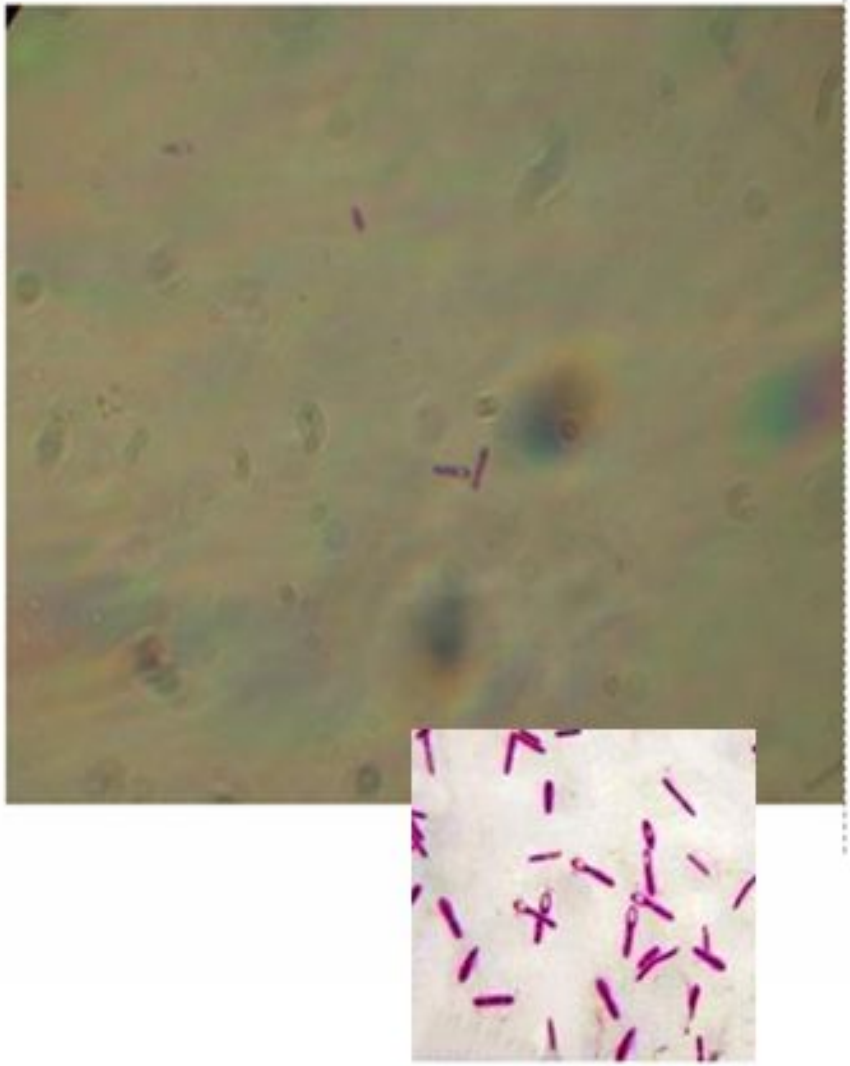
Морфология

Полиморфные палочки;

перитрихиально расположенные жгутики;

Субтерминально расположенные споры (теннисная ракетка);

выраженной капсулы не имеют.

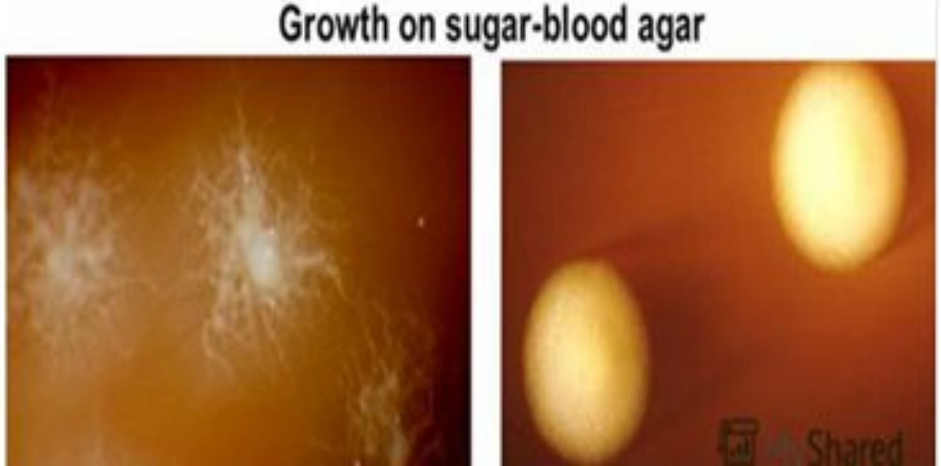


Культивирование

На глюкозо-кровяном агаре -

небольшие прозрачные колонии с ровными или изрезанными краями, окруженные зоной гемолиза;

- на жидких средах – равномерное помутнение и осадок;
- в высоком столбике сахарного агара – вид пушинок или зерен чечевицы;
- ферментативные свойства непостоянны.



Culture

Резистентность

Особенность ботулотоксина: высокая устойчивость к нагреванию (сохраняется в течение 10-15мин при 100^{0}С), к кислой среде, высоким концентрациям поваренной соли, замораживанию, пищеварительным ферментам. Оптимальной температурой для токсинообразования является22-25^{0}С.

Антигенная структура

По АГ токсинов – 7 сероваров: A, B, C, D, E, G, F. Наиболее распространены A, B, E.

В США чаще тип А, в Европе – тип В, в странах, где основным источником белка являются морепродукты – тип Е.

Источник инфекции – животные.

Животные→почва →пищевые продукты (консервы) → анаэробные условия → размножение → экзотоксин.

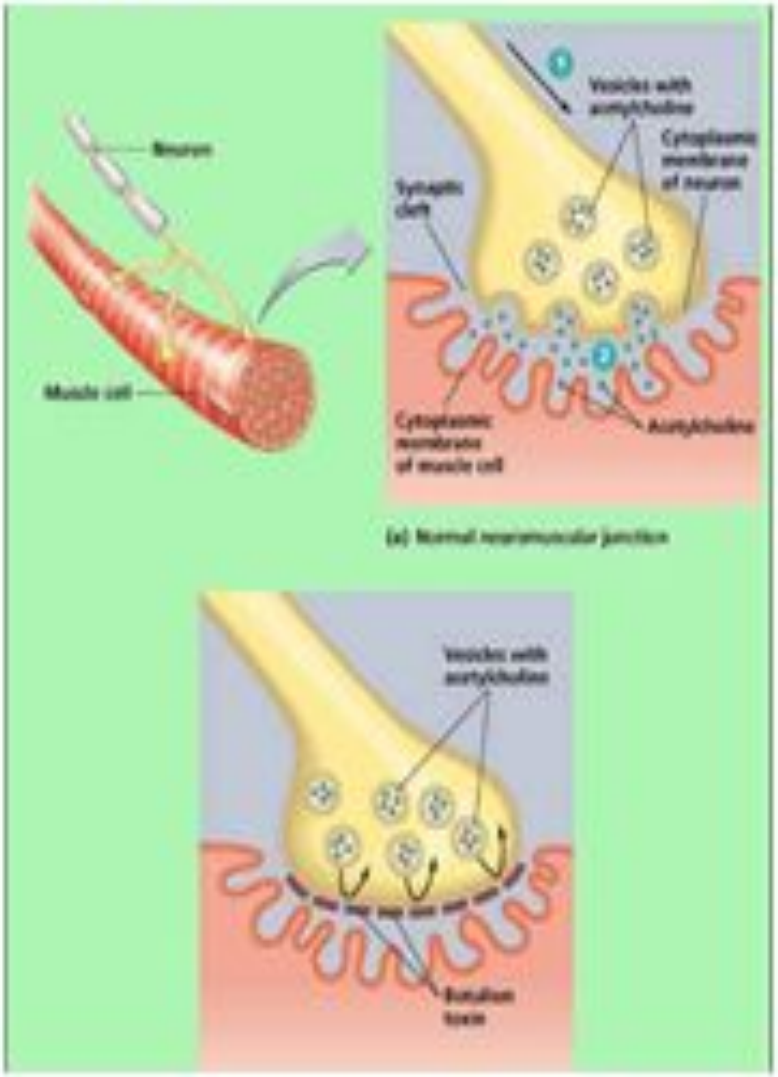
Путь заражения – алиментарный.

Входные ворота – слизистая ЖКТ.

Ботулинический токсин попадает с пищей в ЖКТ, всасывается в кровь → токсинемия.

Патогенез

- Токсин блокирует передачу импульсов через нервно-мышечные синапсы → паралич мышц гортани, глотки, дыхательных мышц, нарушение глотания и дыхания; изменения со стороны органа зрения.
- Летальность 40-50%.
- У грудных детей – даже при попадания в ЖКТ спор
- *C.botulinum*, при родах через пупочный канатик (внезапная детская смертность).
- Ботулизм ран.



Клинические формы

Раневой ботулизм

Пищевой ботулизм

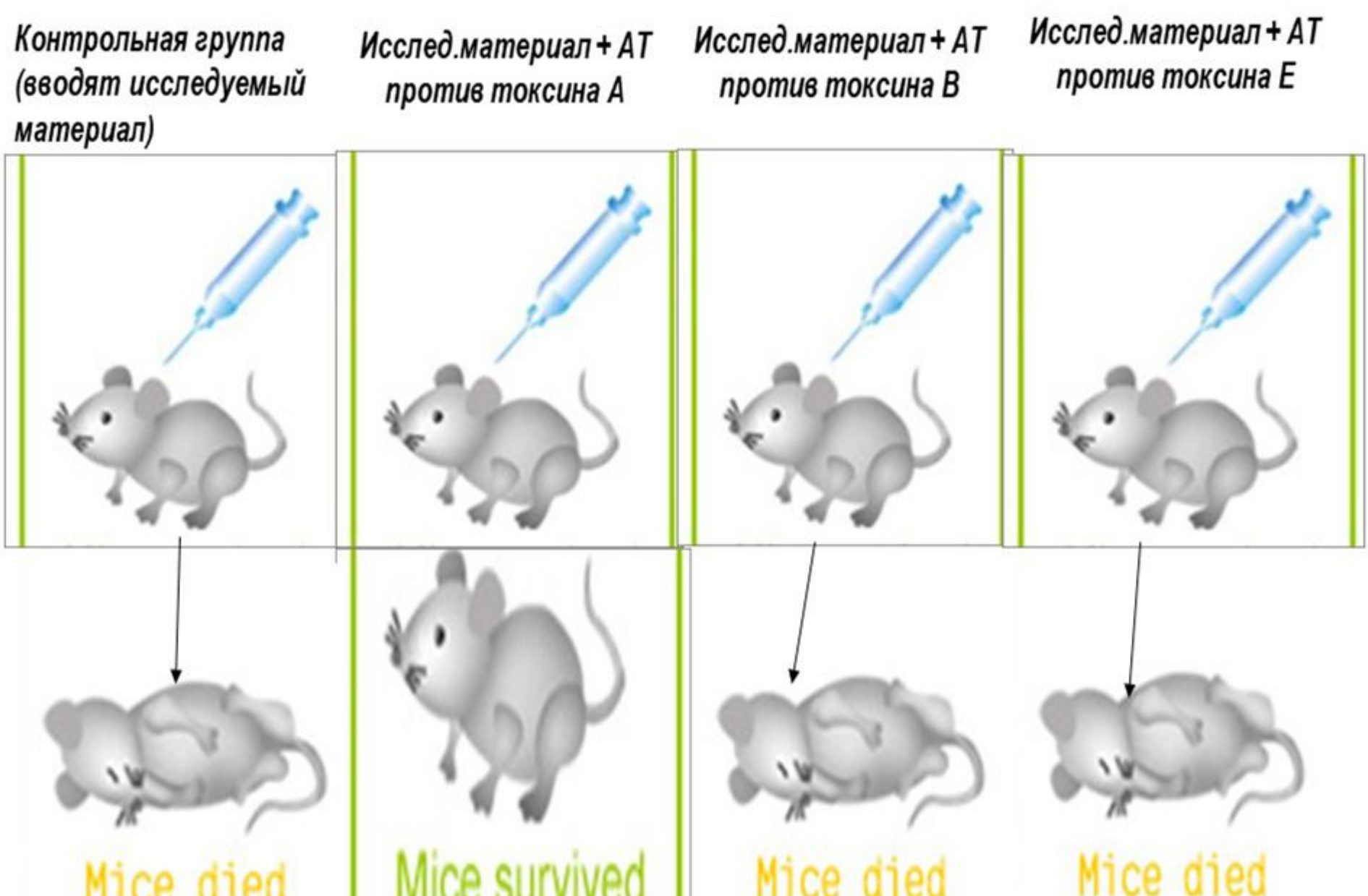
Младенческий ботулизм

Микробиологическая диагностика

Материал: промывные воды желудка, рвотные массы, остатки пищи, кровь.

1. Проводится одновременное выделение возбудителя и определение токсина в исследуемом материале, обязательно определяют серовар токсина.
2. Реакция нейтрализации токсина антитоксической сывороткой на мышах.
3. Определение АТ к ботулотоксину в ИФА.

РЕАКЦИЯ НЕЙТРАЛИЗАЦИИ ТОКСИНА IN VIVO



Лечение и профилактика

Профилактика – тетра-(три-)анатоксины. Курс иммунизации: двукратная вакцинация с интервалом в25-30сут и ревакцинация через6-9мес, последующие однократные ревакцинации каждые 5 лет.

Для **экстренной профилактики и лечения**– сыворотки противоботулинические лошадиные типов А, В, Е. Вводят дробно, по Безредко.

Неспорообразующие анаэробы

Грамотрицательные палочки: *Bacteroides, Prevotella, Porphyromonas, Fusobacterium*

Грамположительные палочки: *Propionebacterim*

Грамположительные кокки: *Peptococcus, Peptostreptococcus*

Грамотрицательные кокки: *Veilonella*

Грамвариабельные микроорганизмы: *Mobiluncus*

Семейство *Bacteroidaceae*

- Род *Bacteroides*

Виды *B.fragilis, B.vulgaris, B.ureolyticus и др.*

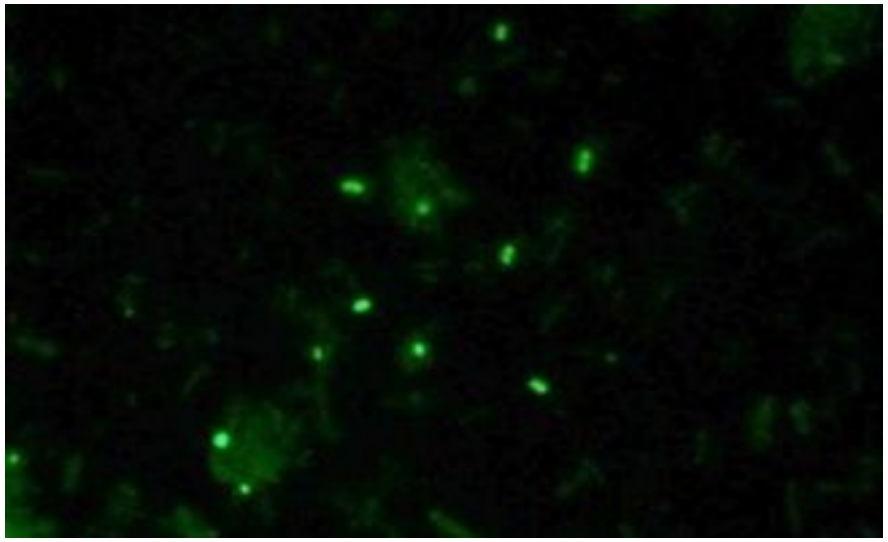
Кроме того, бактероидами принято называть

- Род *Prevotella*

Виды *P.bivia, P. intermedia, P.melaninogenica*

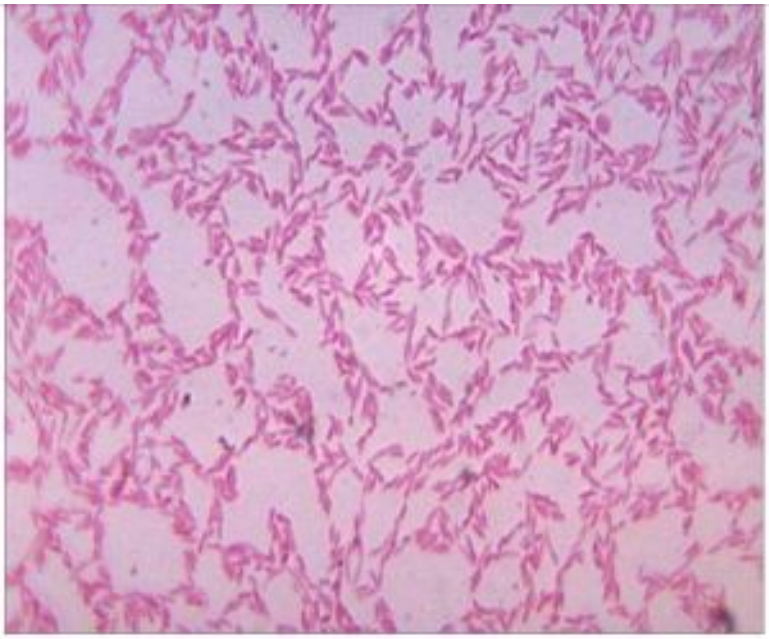
- Род *Porphyromonas*

Виды *P.gingivalis, P.endodontalis, P.asaccharolytica*



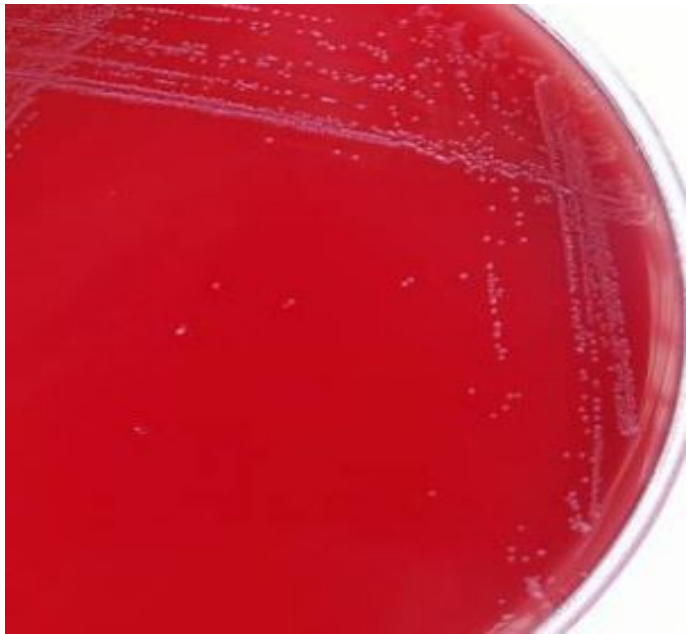
Морфология

- Гр- палочки с высокой степенью полиморфизма, в мазке располагаются поодиночке, иногда парами
- Строгие анаэробы
- Неподвижные, спор не образуют
- Образуют капсулу



Бактероиды, чистая культура, окраска по Граму

- Облигатные анаэробы
- *B.fragilis* образует каталазу и супероксиддисмутазу, поэтому является аэротолерантным
- Хемоорганотрофы.
- Культивируются на средах с низким окислительно-восстановительным потенциалом (с добавлением крови или гемина, витамина К, цистеина, декстрозы), например, КАБ – кровяной агар для бактероидов. Гемолиз не вызывают.



Факторы патогенности

- *Адгезивность:* фимбрии и белки наружной мембраны

- *Факторы инвазии*: нейраминидаза, гиалуронидаза, протеазы (в том числе IgA –протеаза), липазы, нуклеазы; ферменты, инактивирующие бактерицидные соединения кислорода – каталаза, супероксиддисмутаза; гепариназа – разрушает гепарин и способствует развитию тромбоза

- *Токсины*: Эндотоксин, отличающийся от ЛПС других Гр- бактерий; действие проявляется в общей интоксикации организма, биологическа активность ниже, чем у ЛПС энтнробактерий

- *Антифагоцитарные свойства:* полисахаридная капсула (способна сама вызывать развитие стерильных абсцессов)

Роль в патологии

- Абсцессы органов брюшной полости и челюстно-лицевой области

Экология

- Являются представителями нормальной микрофлоры кишечника, ротовой полости, влагалища, причем эпитопы различаются по видовому составу;
- Исключительно эндогенная инфекция
- Как правило, смешанная инфекция (пример микробной ассоциации – B.fragilis, E.coli, Cl.dificile

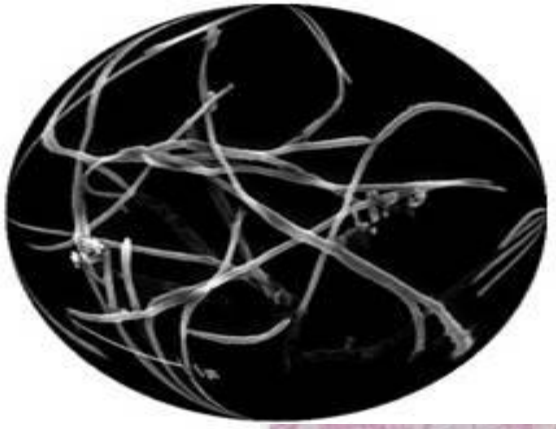
Чувствительность р. *Bacteroides*

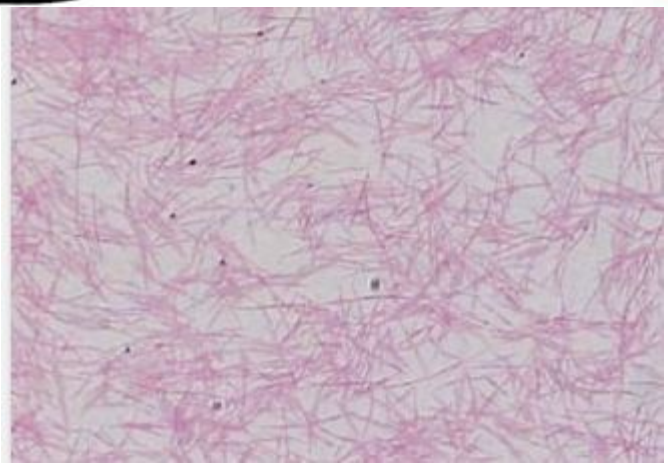
- Имипенем
- Хлорамфеникол
- Метронидазол
- Карбенициллин

p. *Fusobacterium*

- *F. nucleatum (палочка Плаута)*
- *F. necrophorum (палочка Шморля)*

Ротовая полость, толстая кишка



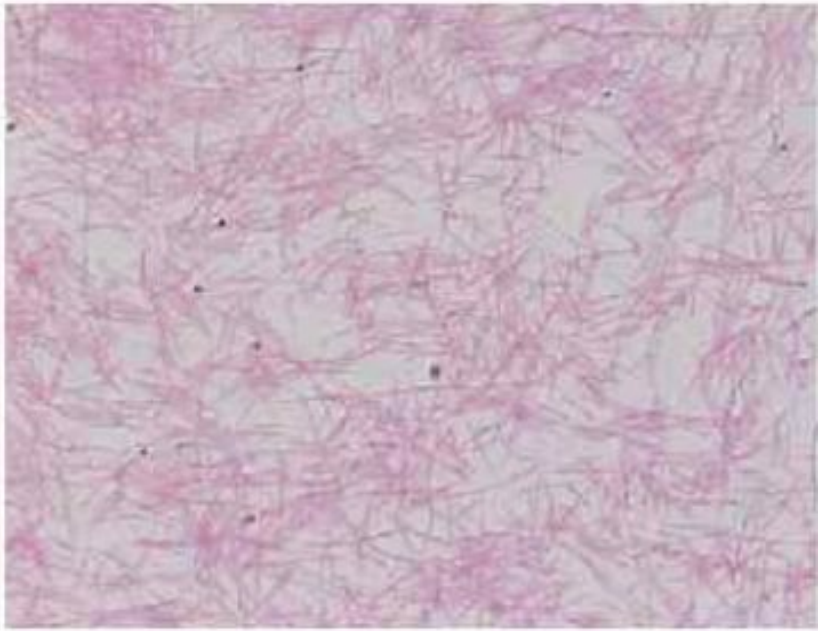


Экологическая ниша

- Слизистая полости рта,
- Верхние дыхательные пути,
- Гениталии,
- Кишечник

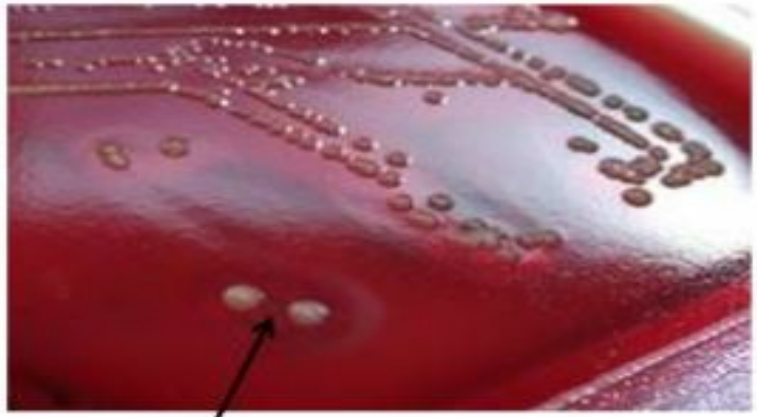
Морфология

- Полиморфные бактерии, но чаще прямые или искривленные палочки с заостренными концами, напоминающие веретено. Располагаются попарно.
- В жидких средах образуют нити
- В цитоплазме –гранулы (выявляют при окраске по Романовскому-Гимзе).
- Большей частью неподвижны, капсул и спор не образуют



Факторы патогенности р. *Fusobacterium*

- фосфолипаза А (облегчает инвазию бактерий в глубокие ткани),
- лейкоцидин (цитотоксическое действие)



гемолиз

Заболевания, вызываемые представителями р. *Fusobacterium*

- гингиво-стоматит,
- ангина Симановского-Венсана (в ассоциации с трепонемами и боррелиями),
- периодонтиты,
- поражение мягких тканей головы, шеи
- сепсис

Чувствительность р. *Fusobacterium*

- Хлорамфеникол
- Метронидазол
- Пенициллин
- Цефатоксим