



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: бактериоиды, 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	Капсулообразование	Анаэробность
C.perfringens	крупная грамположительная палочка	Нет жгутиков	In vivo образует капсулу	Умеренный облигатный анаэроб
C.novyi	крупная грамположительная палочка	Перитрих	Нет капсулы	Строгий облигатный анаэроб
C.septicum	крупная грамположительная палочка	Перитрих	Нет капсулы	Строгий облигатный анаэроб
C.histolyticum	крупная грамположительная палочка	Перитрих	Нет капсулы	Умеренный облигатный анаэроб
C.sordellii	крупная грамположительная палочка	Перитрих	Нет капсулы	Умеренный облигатный анаэроб

Морфология

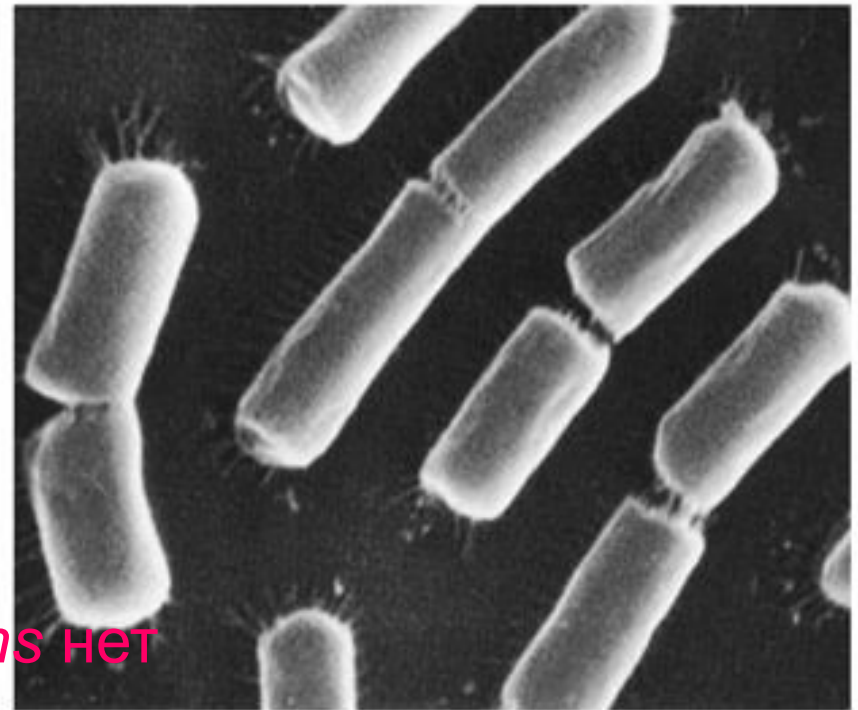
Полиморфные
грамположительные
палочки;

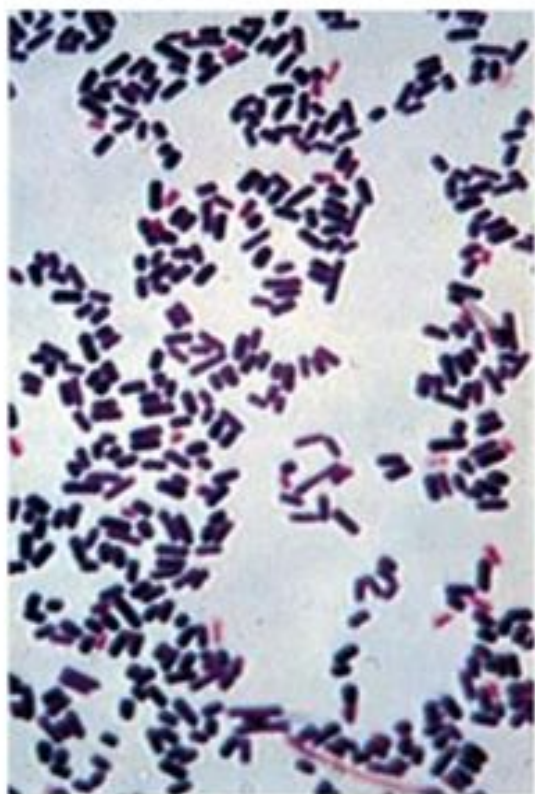
овальные крупные
споры;

C.perfringens –

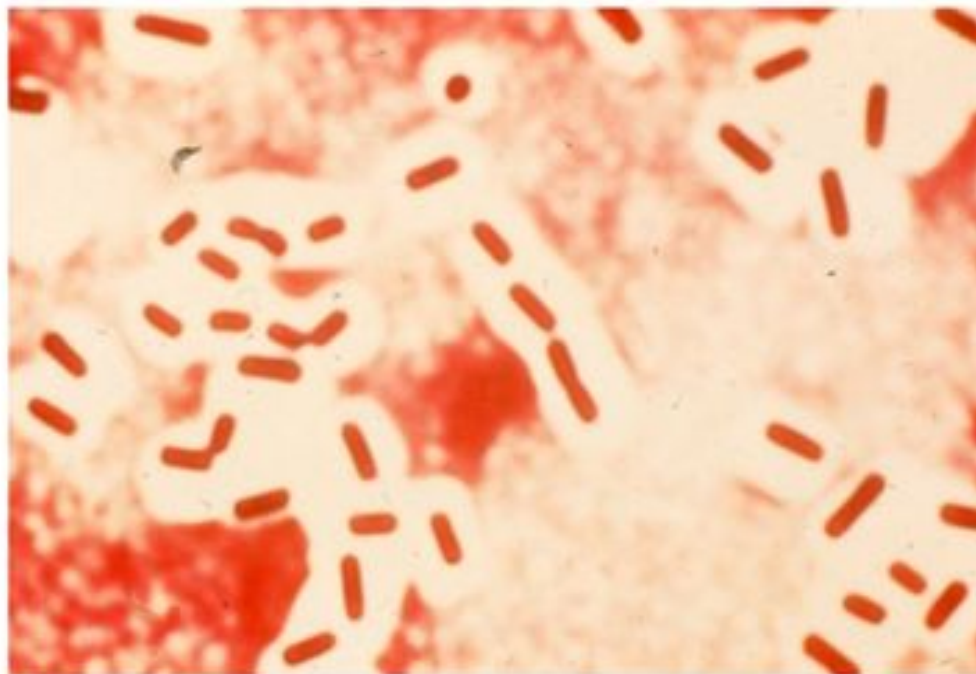
капсула;

Жгутики. - у *C.perfringens* нет

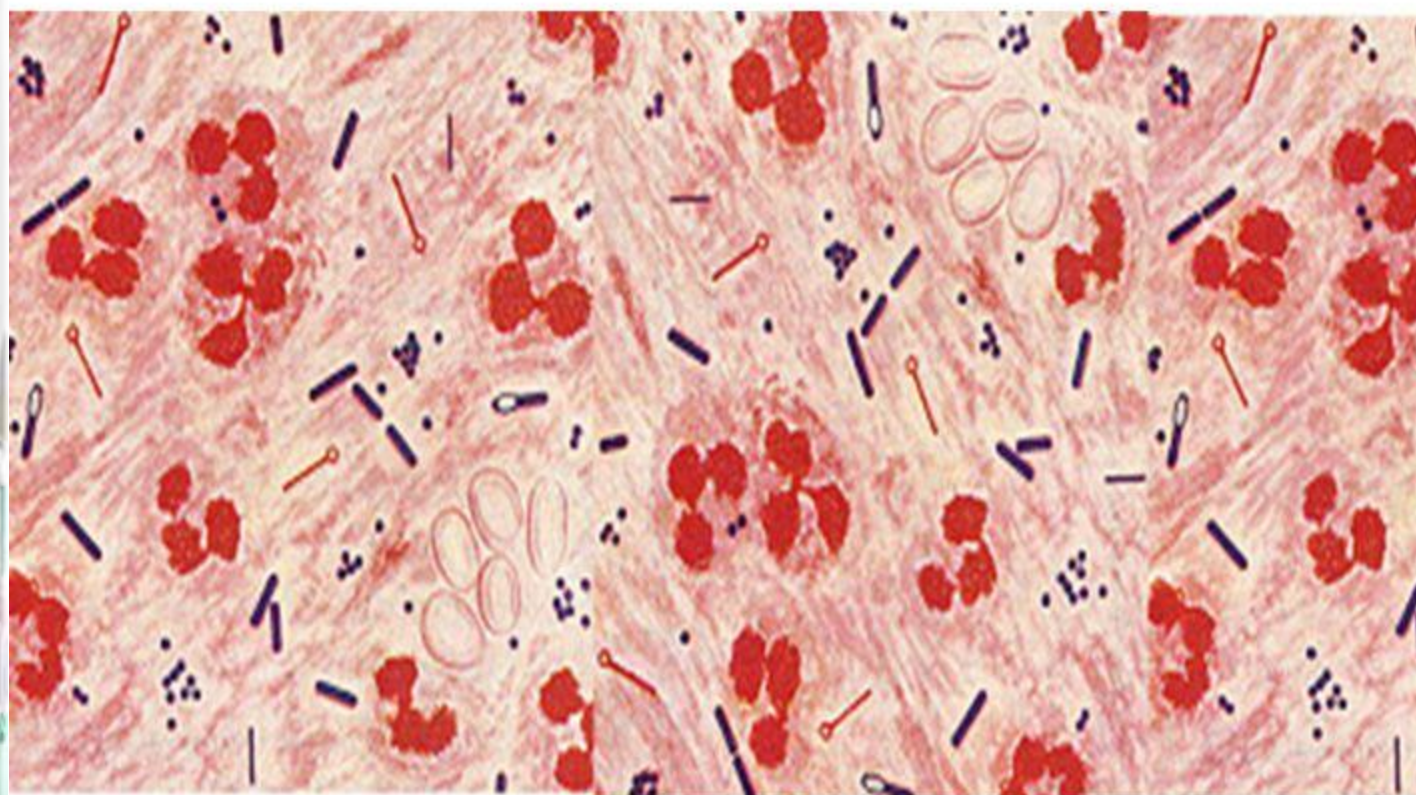




C. perfringens (чистая культура) окраска по Граму



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



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

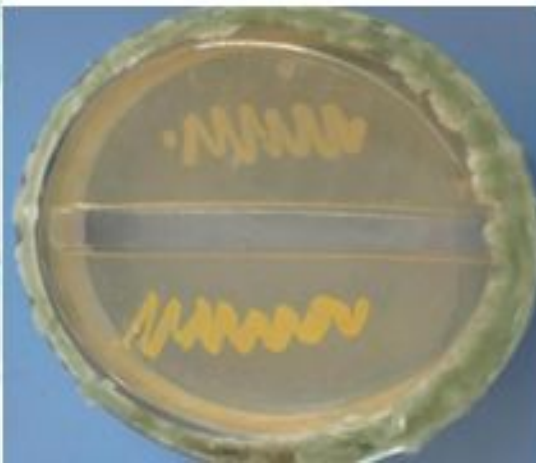
Cl. perfringens культуральные свойства

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

Wilson-Blair agar



Рост на железосульфитном агаре



Культуральные свойства

Облигатные анаэробы;

R и S-колонии;

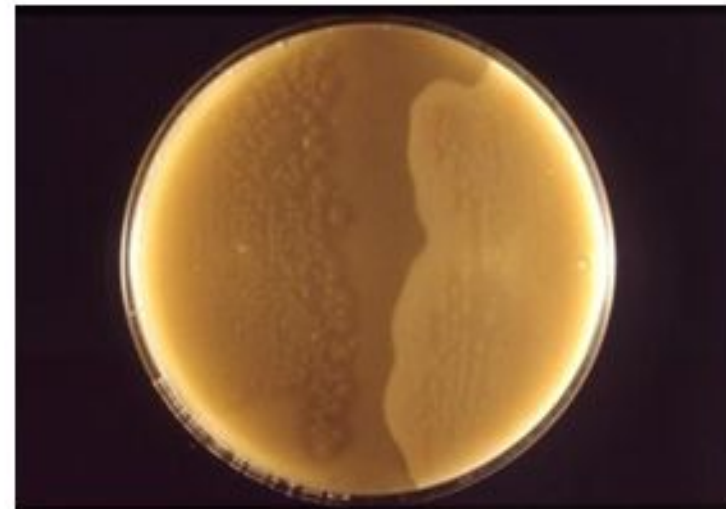
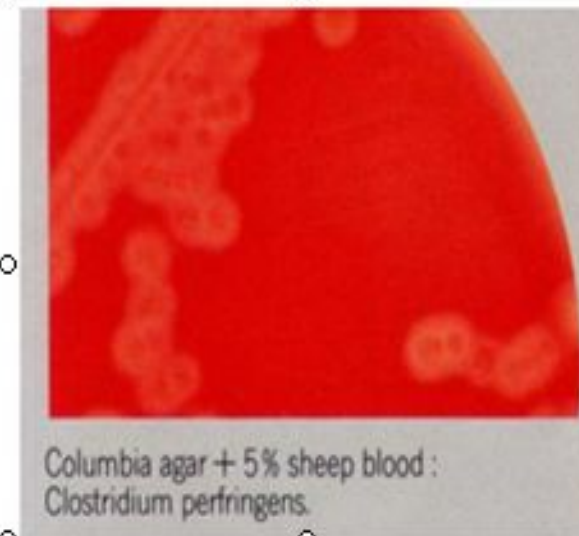
гемолиз;

ЖСА – лецитиназа;

среда Вильсон-Блера;

бурное газообразование;

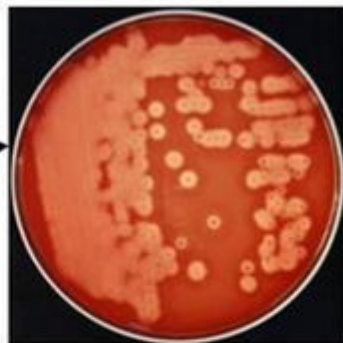
Высокая гликолитическая,
слабая протеолитическая
активность.



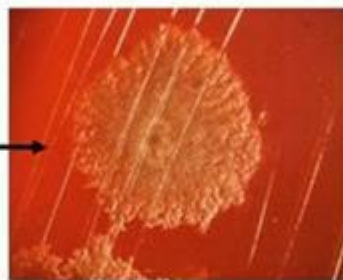
Differentiation of Clostridia due to culture properties

- Sugar-blood agar:

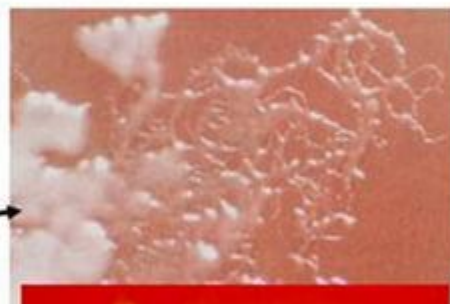
- *C. perfringens*



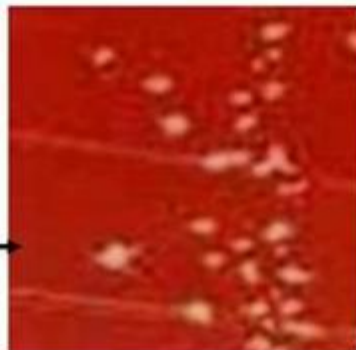
- *C. novyi*



- *C. septicum*



- *C. histolyticum*





Clostridium perfringens

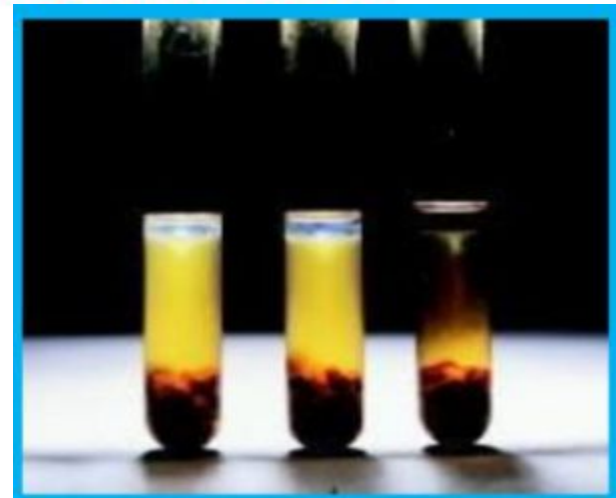
*Клостридии створаживают
молоко*



Clostridium perfringens
Thioglycollate & ANABAP

*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 к цитолизу

Каппа– токсин (коллагеназа, желатиназа) – некротическое действие

Лямбда - токсин – протеаза

Гиалуронидаза

ДНКаза

Нейраминидаза – модифицирует рецепторы на клетках

«Малые» токсины усиливают действие альфа-токсина



Эпидемиология возбудителя газовой гангрены.

- o *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

Gas gangrene



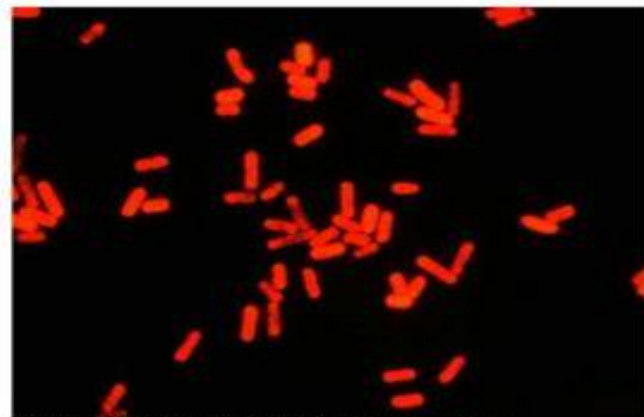
MyShared

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

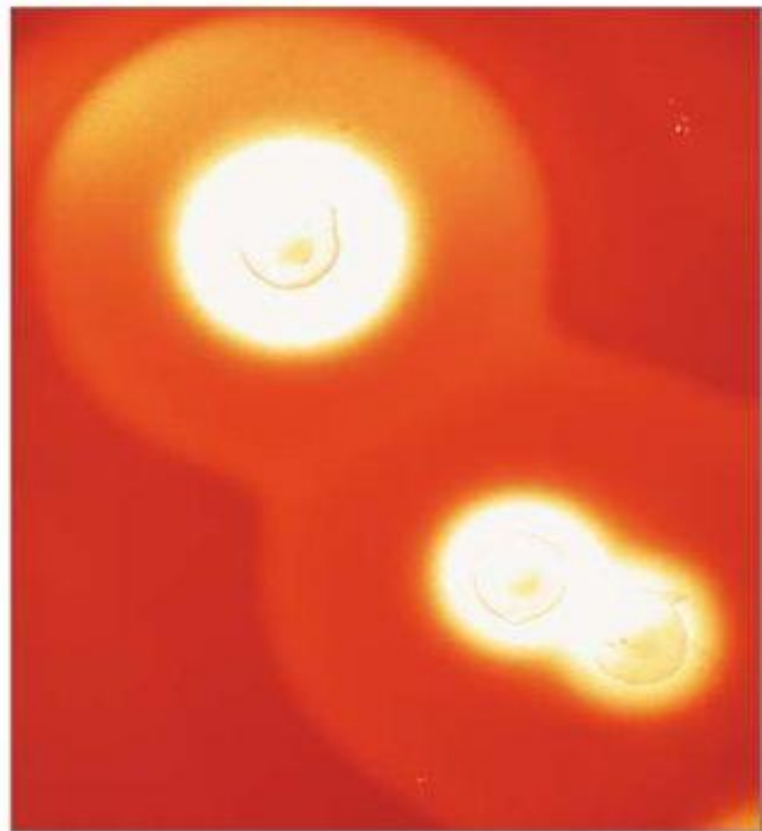
Клостридии

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 гемоллиза 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.

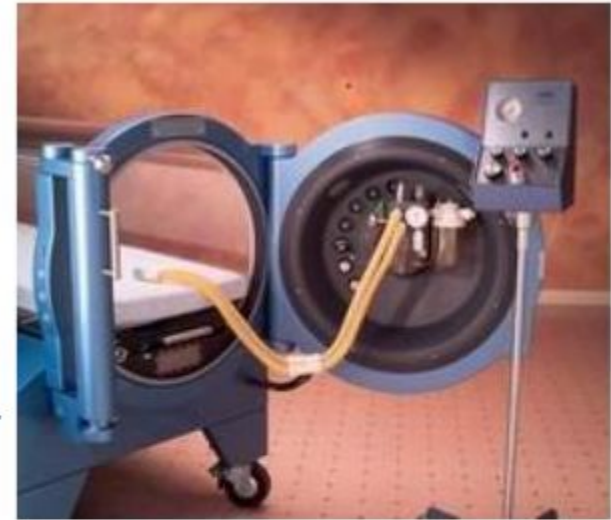
Специфическая профилактика – анатоксин *S.perfringens* и *S.novi* в составе секстанатоксина.

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

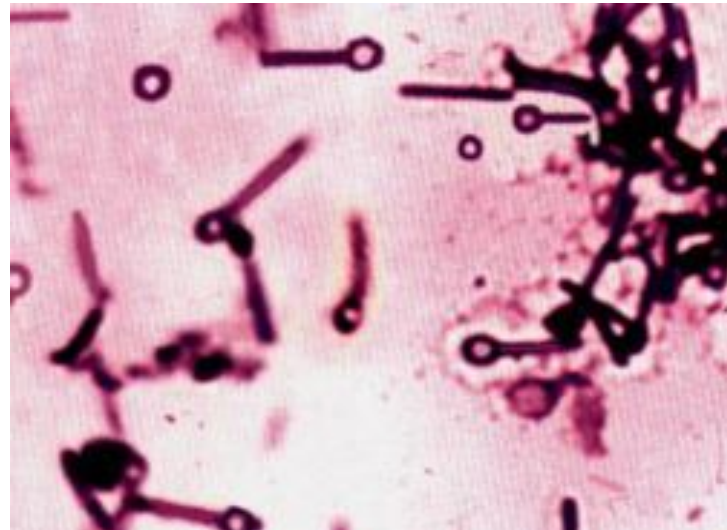
Clostridium tetani

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



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 $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 $115\text{ }^{\circ}\text{C}$ разрушает их только через 20 мин, споры совершенно не чувствительны к низким температурам. Они годами переносят температуру $40\text{-}60\text{ }^{\circ}\text{C}$,

Антигенная структура

O-АГ – видоспецифический;

H-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.



МикроХИТ

ВГНЦ им.Н.А.Мухоморова Минздрава России
Россия, 119004, С. Мяскино, ул. 1-ая Дубровинки, д. 10
тел. (495) 710-27-67
Адрес производства:
Россия, 614000, Пермский край, г. Пермь, ул. Братская, д. 177
тел. (343) 291-84-88



Иммуноглобулин человека противостолбнячный

раствор для внутримышечного введения 250 МЕ
10 ампул по 250 МЕ (мл)

Информация в системе: Стерильно
1 доза препарата содержит:

Активный ингредиент – очищенный донорский человеческий иммуноглобулин противостолбнячный – 250 МЕ
Вспомогательные вещества – глицерин – 0,5 мл
вещества консерванта – 0,25 мг (0,1%)

Серия _____ Дата выпуска _____ Годен до _____

Р № ДСР-00791/08 _____
Способ применения – см. Инструкцию _____ Отпускается по рецепту _____

Активна к ВПЧ-1, ВПЧ-2, к вирусу гепатита С _____
и коварный агентом вируса гепатита В _____

Хранить при температуре от 2 до 8 °С

Хранить в недоступном для детей месте



Вакцина коклюшно-дифтерийно-столбнячная 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.

Самогенез

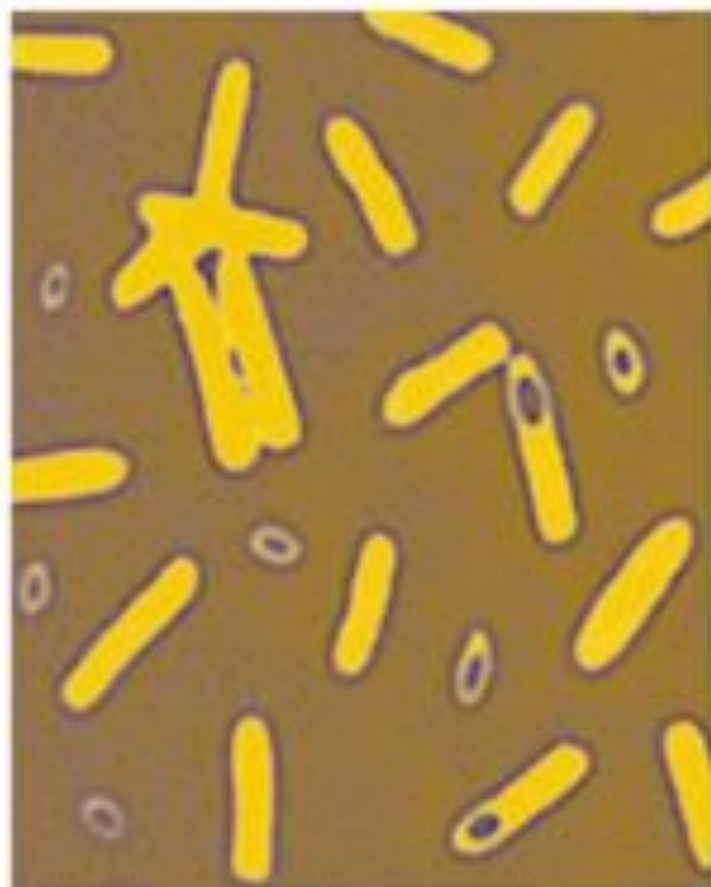
Иммунитет не вырабатывается, хотя столбняк обладает выраженной иммуногенной активностью (быстрое проникновение в нейроны).

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

Возбудитель ботулизма

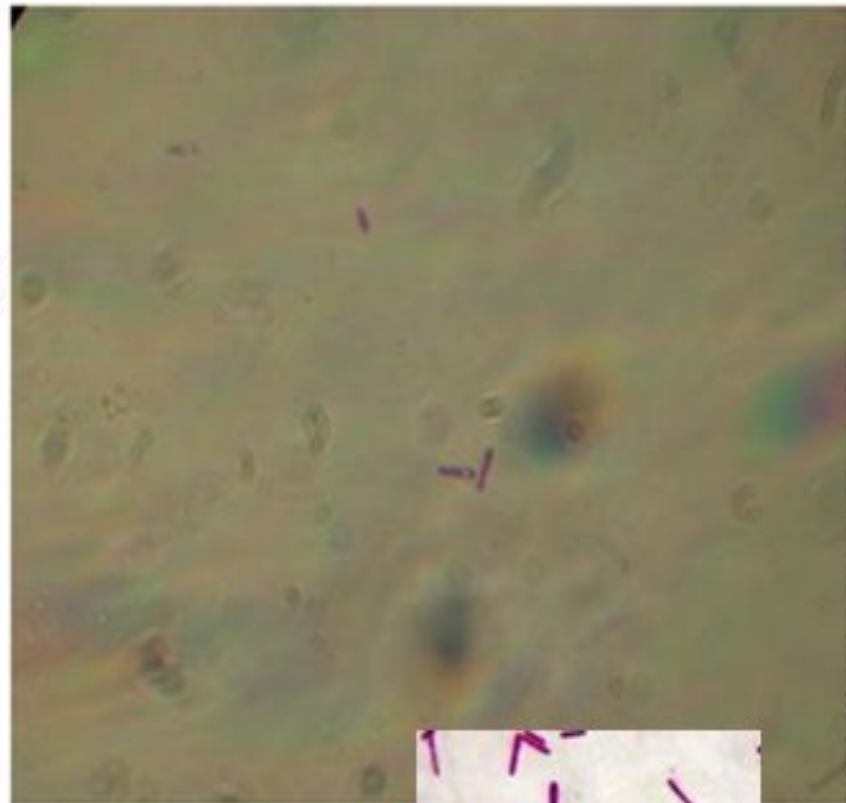
Clostridium botulinum

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



Морфология

Полиморфные палочки;
перитрихально
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.

Growth on sugar-blood agar



Culture



Резистентность

Особенность ботулотоксина: высокая устойчивость к нагреванию (сохраняется в течение 10-15мин при 100°C), к кислой среде, высоким концентрациям поваренной соли, замораживанию, пищеварительным ферментам. Оптимальной температурой для токсинообразования является $22-25^{\circ}\text{C}$.

Антигенная структура

По АГ токсинов – 7 сероваров: А, В, С, D, Е, G, F. Наиболее распространены А, В, Е.

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

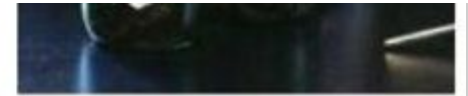
Источник инфекции – животные.

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

Путь заражения – алиментарный.

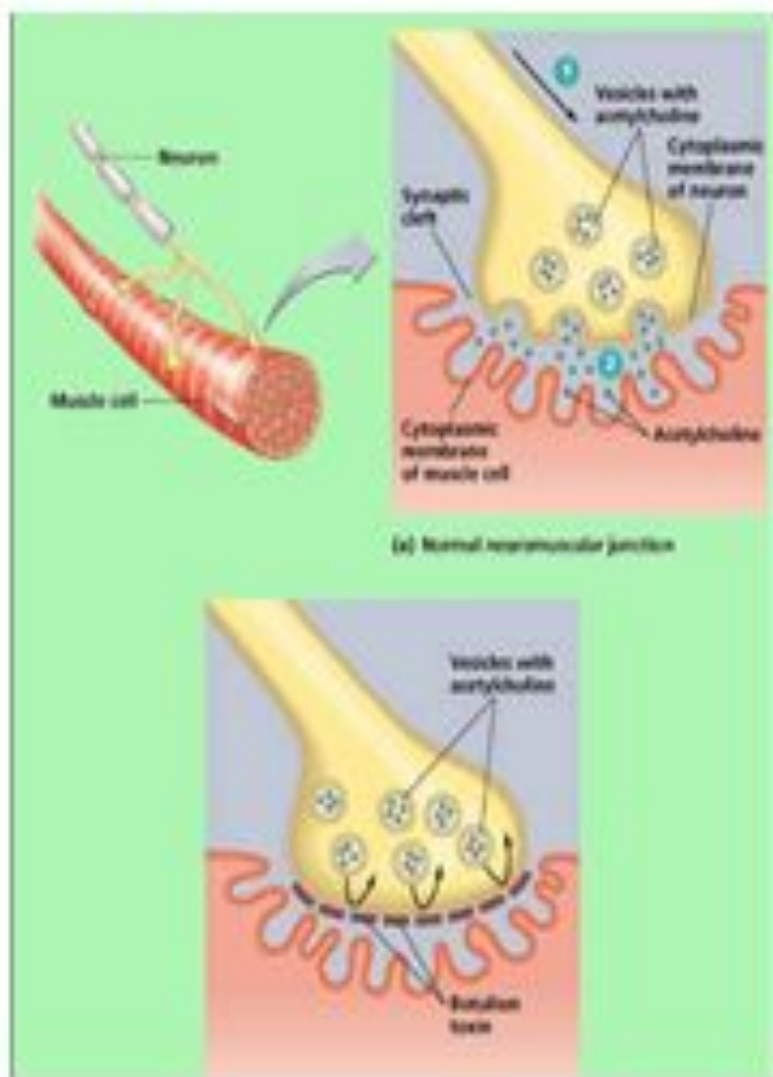
Входные ворота – слизистая ЖКТ.

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 попадании в ЖКТ спор
- *S. 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.

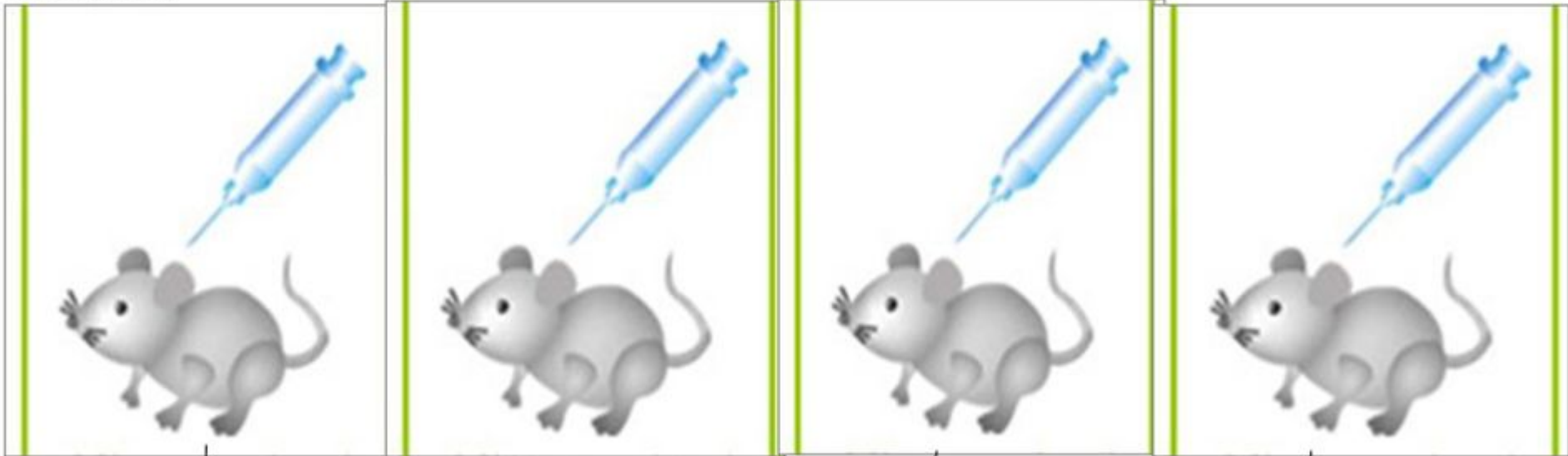
РЕАКЦИЯ НЕЙТРАЛИЗАЦИИ ТОКСИНА IN VIVO

Контрольная группа
(вводят исследуемый
материал)

Исслед.материал + АТ
против токсина А

Исслед.материал + АТ
против токсина В

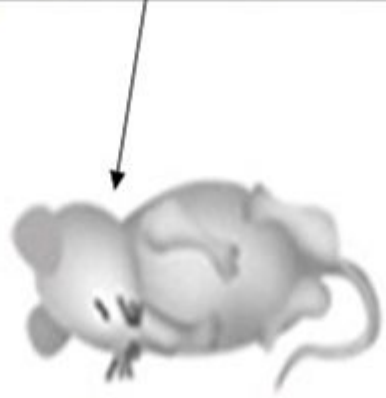
Исслед.материал + АТ
против токсина Е



Mice died



Mice survived



Mice died



Mice died

Лечение и профилактика

Профилактика – тетра-(три-)анатоксины.
Курс иммунизации: двукратная вакцинация с интервалом в 25-30 сут и ревакцинация через 6-9 мес, 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*

Грамовариабельные микроорганизмы: *Mobiluncus*

Семейство *Bacteroidaceae*

- Род *Bacteroides*

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

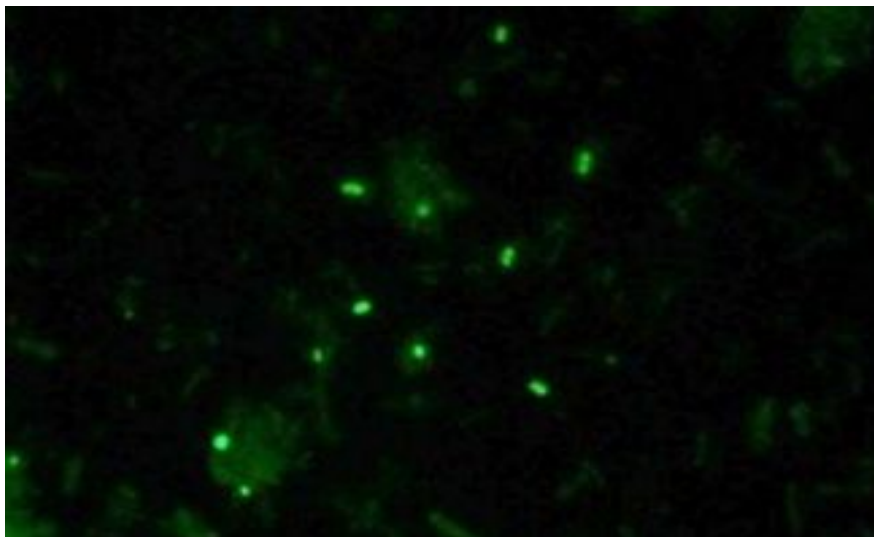
Кроме того, бактероидами принято называть

- Род *Prevotella*

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

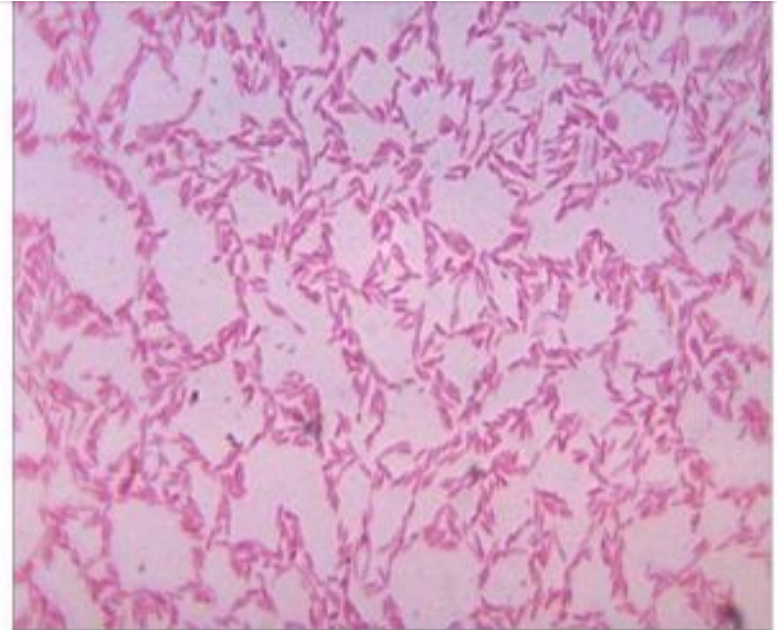
- Род *Porphyromonas*

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



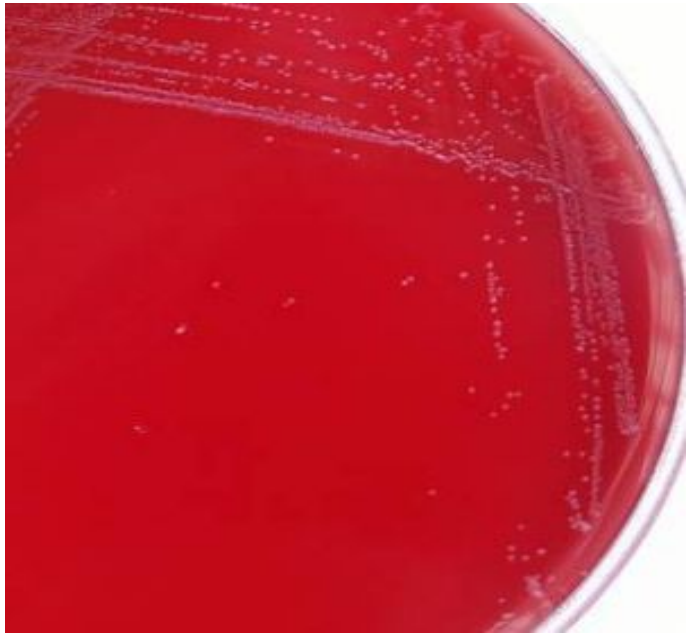
Морфология

- 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

- Obligatnye anaeroby
- *B. fragilis* obrazuet katalazu i superoksididismutazu, poetomu yavlyetsya aerotolerantnym
- Xemoorganotrofy.
- Kultiviruyutsya na sredax s nizkim oksiditel'no-vosstanovitel'nyim potentsialom (s dobavleniem krovi ili gema, vitamina K, tsisteina, dekstrozy), naprimer, KAB – krovyanoy agar dlya bakteroidov. Gemoлиз ne vyzyvayut.



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, биологическая активность ниже, чем у ЛПС энтеробактерий
- Антифагоцитарные свойства: полисахаридная капсула (способна сама вызывать развитие стерильных абсцессов)



Роль в патологии

- Абсцессы органов брюшной полости и челюстно-лицевой области

Экология

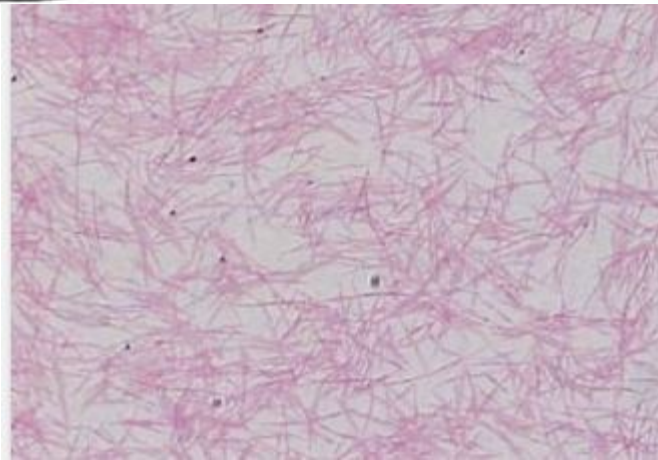
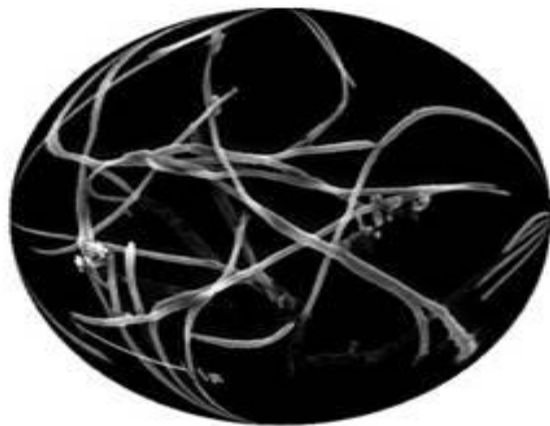
- Являются представителями нормальной микрофлоры кишечника, ротовой полости, влагалища, причем эпитопы различаются по видовому составу;
- Исключительно эндогенная инфекция
- Как правило, смешанная инфекция (пример микробной ассоциации – *B.fragilis*, *E.coli*, *Cl.dificile*)

Чувствительность р. *Bacteroides*

- Имипенем
- Хлорамфеникол
- Метронидазол
- Карбенициллин

р. *Fusobacterium*

- *F. nucleatum* (палочка Плаута)
 - *F. necrophorum* (палочка Шморля)
- Ротовая полость, толстая кишка



Экологическая ниша

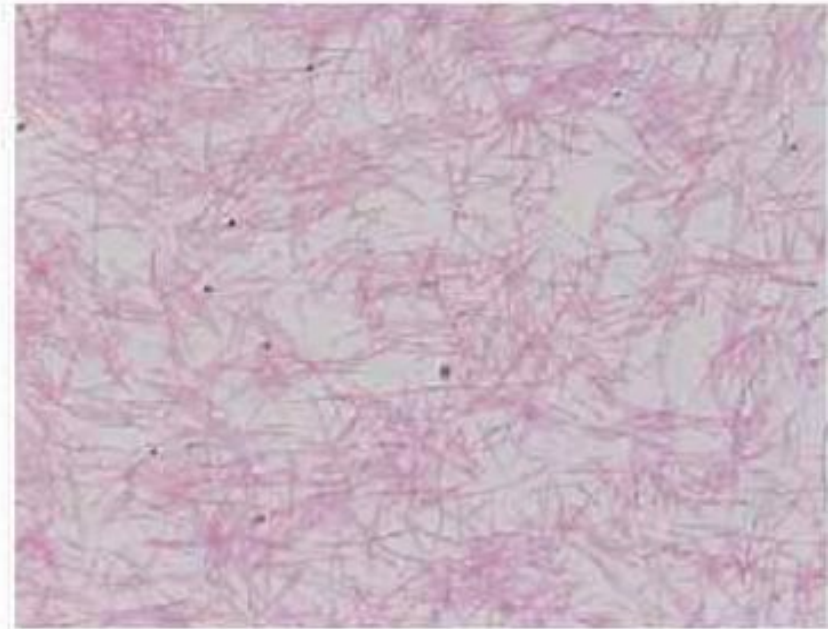


- Слизистая полости рта,
- Верхние дыхательные пути,
- Гениталии,
- Кишечник



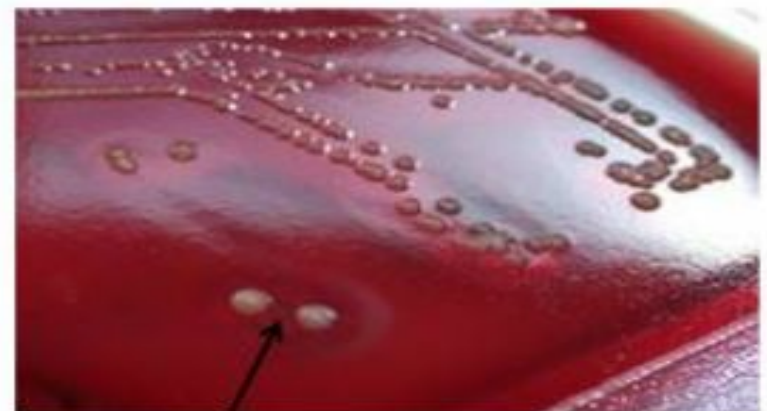
Морфология

- 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 *p. 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