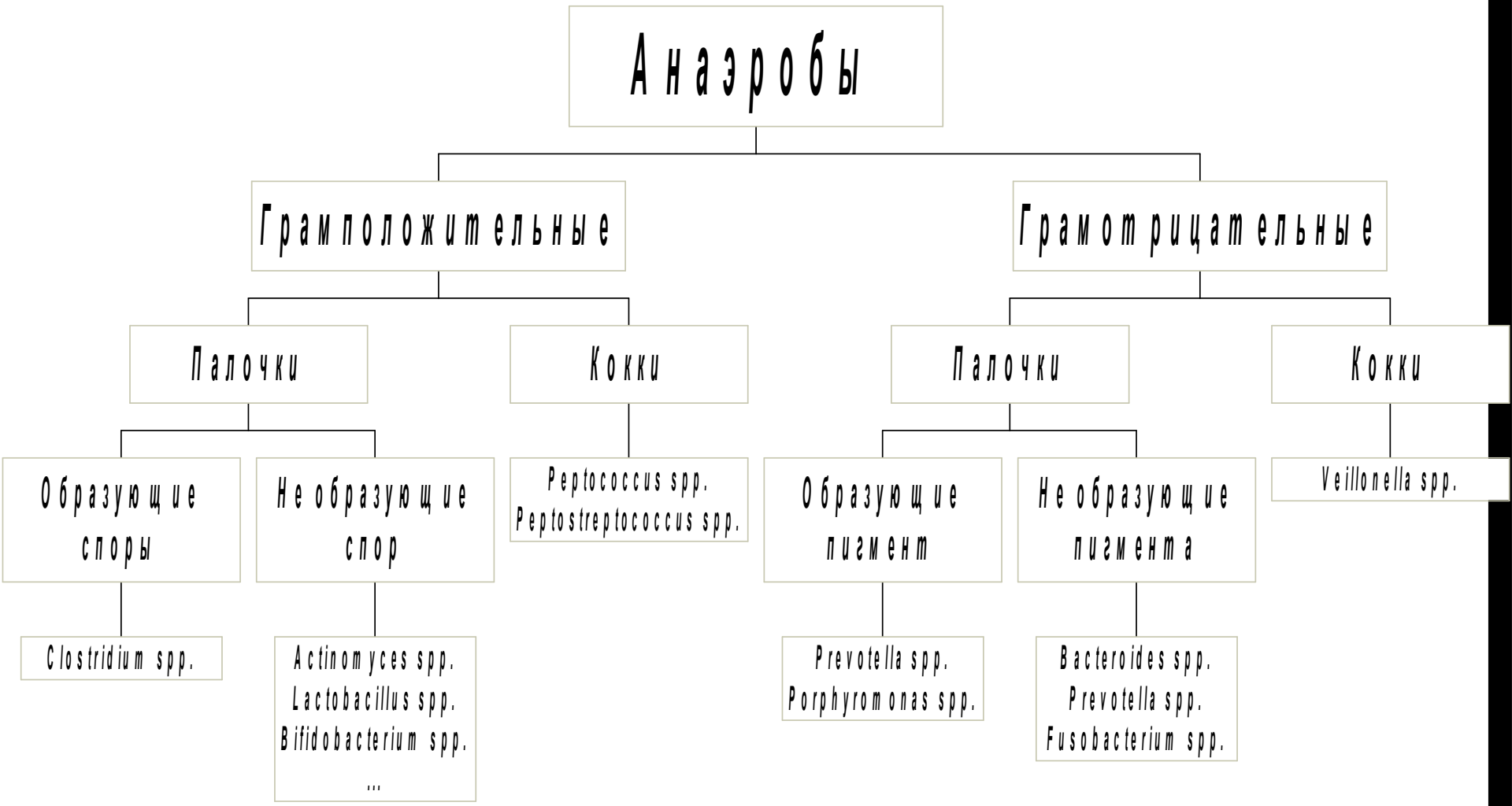
ДИАГНОСТИКА АНАЭРОБНОЙ ИНФЕКЦИИ

Широкова Ирина Юрьевна

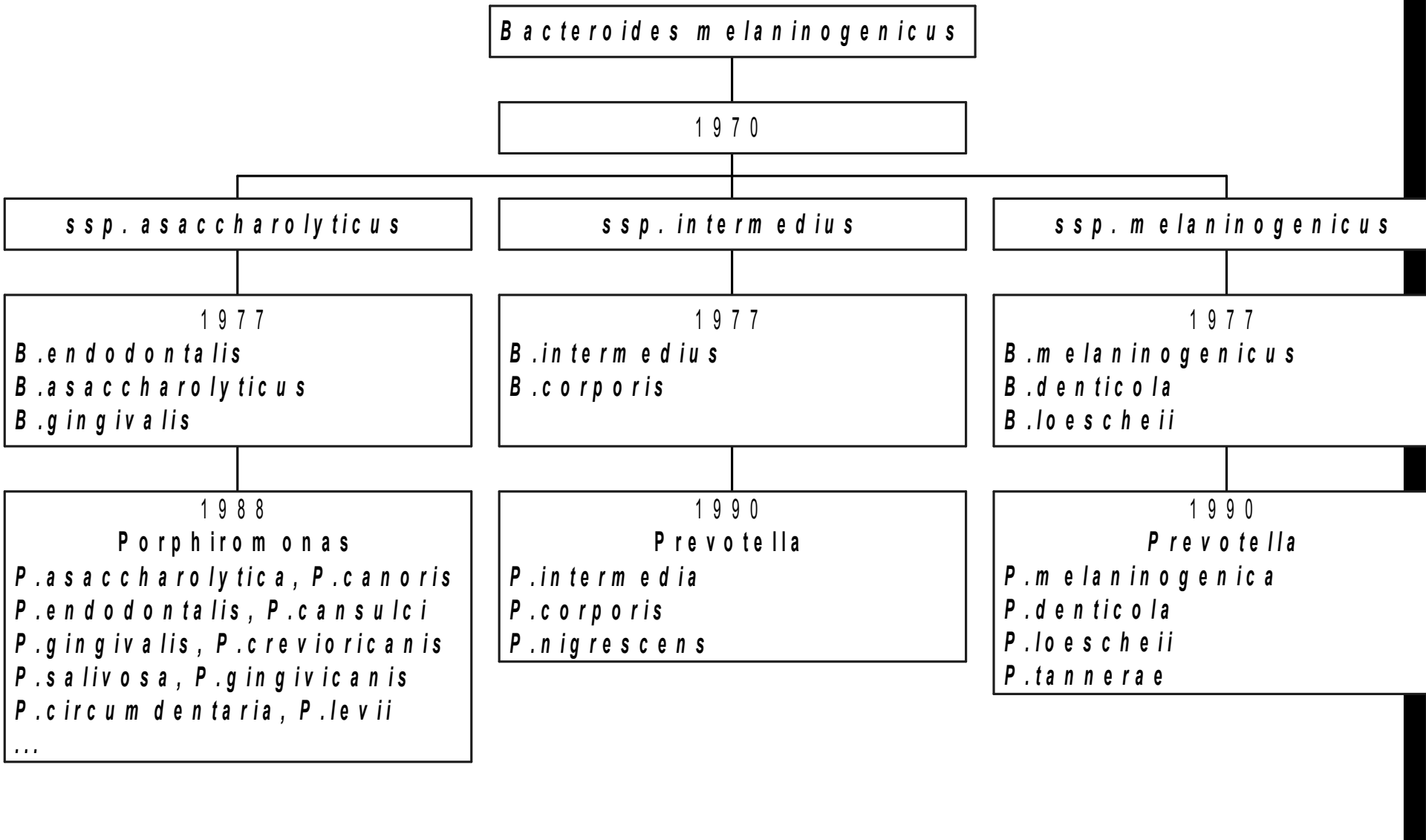
к.м.н., заведующий бактериологической лабораторией, руководитель отдела лабораторных исследований НИИ профилактической медицины Университетской клиники ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России (Нижний Новгород)

Анаэробная инфекция — тяжёлая токсическая раневая **инфекция**,вызванная **анаэробными** микроорганизмами, с преимущественным поражением соединительной и мышечной ткани.

КЛАССИФИКАЦИЯ АНАЭРОБОВ, ИМЕЮЩИХ МЕДИЦИНСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ



ИЗМЕНЕНИЯ В ТАКСОНОМИИ ПИГМЕНТИРОВАННЫХ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ НЕСПОРООБРАЗУЮЩИХ АНАЭРОБОВ



ОСНОВНЫЕ БИОТОПЫ, ЗАНИМАЕМЫЕ ОБЛИГАТНЫМИ АНАЭРОБАМИ В ОРГАНИЗМЕ

- **Ротовая полость**
  - **Peptostreptococcus**
  - **Veillonella**
  - **Fusobacterium**
  - **Centipeda и др.**
- **Кишечник**
  - **Bacteroides**
  - **Coprococcus**
  - **Veillonella и др.**
- **Влагалище**
  - **Mobiluncus**
  - **Veillonella**
  - **Bacteroides**
  - **Fusobacterium и др.**

ОСОБЕННОСТИ ИНФЕКЦИЙ, ОБУСЛОВЛЕННЫХ НЕСПОРООБРАЗУЮЩИМИ АНАЭРОБАМИ

- ✓ Эндогенные инфекции
- ✓ Предрасполагающие факторы: повреждения кожи и слизистых, (операции, травмы, инъекции), злокачественные новообразования, некроз, инородные тела
- ✓ Как правило обусловлены ассоциацией из нескольких микроорганизмов

ЧАСТОТА ОБНАРУЖЕНИЯ АНАЭРОБОВ В СОСТАВЕ НОРМАЛЬНОЙ МИКРОФЛОРЫ

	Кожа	Ротовая полость	Кишечник	Гениталии
Bacteroides	0	1	2	V
Prevotella	0	2	2	1
Porphyromonas	0	2	1	V
Fusobacterium	0	2	2	1
Veillonella	0	2	1	V
Peptostreptococcus	1	2	2	1
Propionibacterium	2	v	V	V
Actinomyces	0	1	1	0
Eubacterium	0	1	1	V
Bifidobacterium	0	1	2	0
Lactobacillus	0	1	1	V
Clostridium	0	V	2	v

ПОВРЕЖДЕНИЕ АНАЭРОБОВ КИСЛОРОДОМ

Окисление липидов мембран

Инактивация ферментов

Прямое повреждение на уровне генома

ЗАЩИТА ОТ КИСЛОРОДА

Супероксид дисмутаза

Каталаза

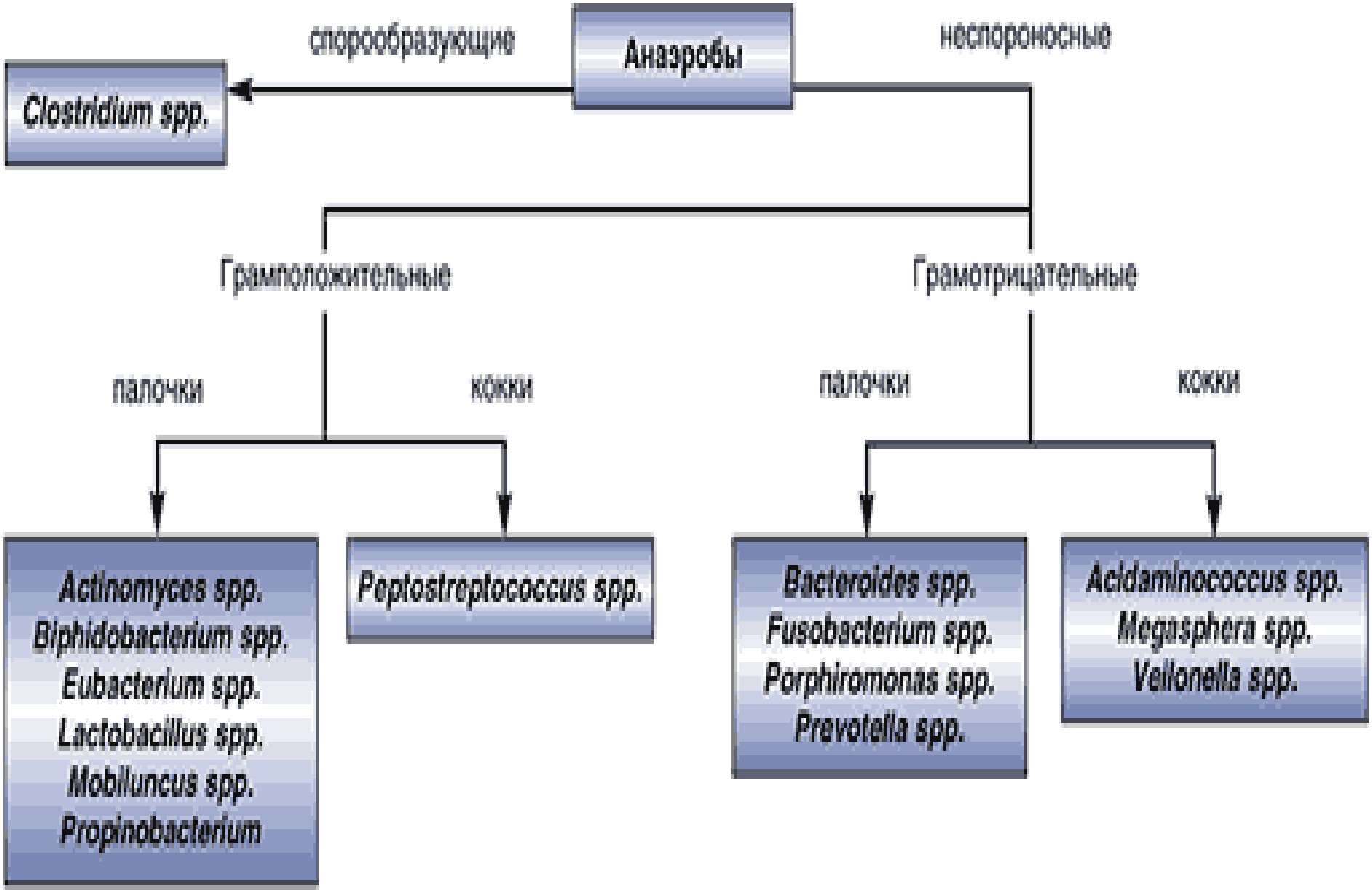
Пероксидаза

Витамин С

Витамин Е

Мочевая кислота

КЛАССИФИКАЦИЯ АНАЭРОБОВ



НЕСПОРООБРАЗУЮЩИЕ АНАЭРОБЫ

Характеризуются:

- ✓ **высокой чувствительностью к токсическому действию кислорода**
- ✓ **требовательны к питательным средам, способны обмениваться плазмидами с другими микроорганизмами, приобретая множественную резистентность и увеличивая вирулентные свойства**
- ✓ **обладают высокой протеолитической активностью, выделяя токсические продукты метаболизма такие как индол, сероводород, летучие жирные кислоты и др.**

ФАКТОРЫ ВИРУЛЕНТНОСТИ АНАЭРОБОВ

Капсула	Абсцедирование
Супероксид дисмутаза Каталаза	Повышение толерантности к кислороду
Иммуноглобулин протеазы	Подавление защитных сил макроорганизма
Липополисахарид	Воспаление
Лейкотоксин	Цитопатическое действие
Гиалуронидаза Коллагеназа Нейраминидаза Фибринолизин Эластаза	Деструкция тканей
Гепариназа	Нарушение кровоснабжения пораженной области

КЛИНИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ АНАЭРОБНОЙ ИНФЕКЦИИ

- ✓ Неприятный запах отделяемого;
- ✓ Некроз тканей, формирование абсцессов;
- ✓ Локализация около поврежденной слизистой;
- ✓ Развитие процесса на фоне лечения аминогликозидами;
- ✓ Черное окрашивание экссудата;
- ✓ Септический тромбофлебит.

ВЗЯТИЕ МАТЕРИАЛА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ НА АНАЭРОБЫ

Область	*Материал и способ получения*
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**

МАТЕРИАЛ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

Не целесообразно исследовать

- **мокрота**
- **отделяемой, полученное при бронхоскопии**
- **мазки с поверхности ран**
- **свободно выпущенная моча**

НАИБОЛЕЕ КЛИНИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫЕ АНАЭРОБЫ

- **НЕСПОРООБРАЗУЮЩИЕ**
  - ***Bacteroides fragilis group***
  - ***Prevotella melaninogenicus***
  - ***Fusobacterium nucleatum***
  - ***Peptococcus asaccharolyticus***
  - ***Peptostreptococcus anaerobius***

- **СПОРООБРАЗУЮЩИЕ**
  - ***Clostridium spp.***

БАКТЕРОИДЫ (род *Bacteroides*)

Группа fragilis

B. fragilis*

B. vulgatus

B. distasonis

B. ovatus

B. thetaiotaomicron*

B. merdae

B. caccae

B. eggerthii

B. uniformis

B. stercoris

B. splanchnicua

*** Степень патогенности для человека**

Группа melaninogenicus-oralis

B. melaninogenicus

B. gingivalis

B. asaccharolyticus

B. loescheii

B. denticola

B. intermedius**

B. corporis

B. levii

B. macacae

B. oralis

B. oris*

B. buccae*

B. zoogleoformans

B. buccalis

B. Veroralis и др.

БАКТЕРОИДЫ (род *Bacteroides*)

Из известных свыше 40 видов бактероидов самыми частыми возбудителями воспалительных процессов являются B. fragilis и B. melaninogenicus

- мелкие полиморфные палочки (0,8-1,5 мкм), которые располагаются в одиночку, в виде диплобактерий, коротких цепочек;

- одни виды имеют жгутики, другие неподвижные, отдельные из них образуют капсулы;

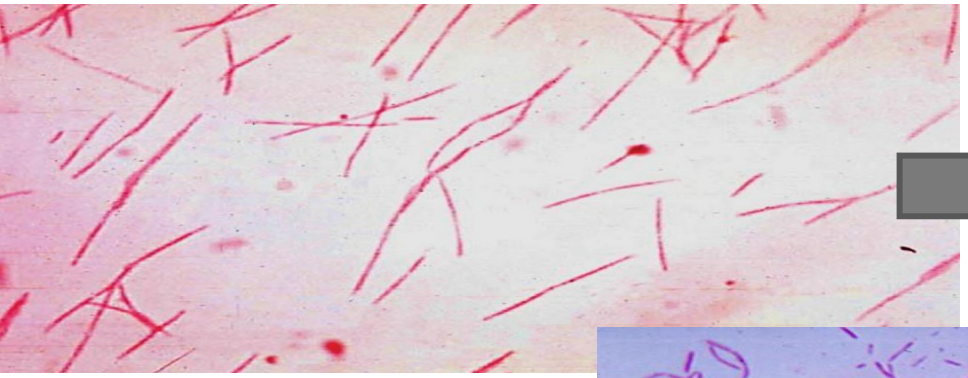
- прихотливые к питательным средам;

- культивируют в анаэробных условиях на кровяных средах с добавлением гемина, витамина К, глюкозы.

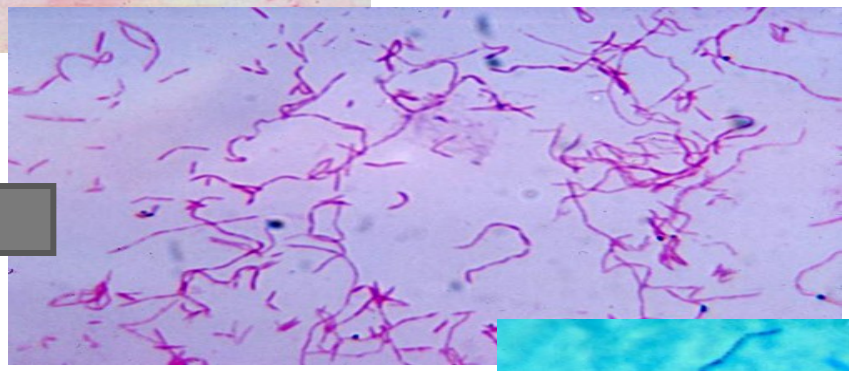
Посевы инкубируют на протяжении 5-7 дней.

- Бактероиды ферментуют многие углеводы, разлагают пептоны.
- Они населяют кишечник, другие биотопы и входят в состав нормальных микробиоценозов человека.
- Чаще вызывают эндогенные инфекции, возникающие у лиц с имунодефицитными состояниями.
- Заболевания в большинстве случаев имеют гнойно-воспалительный характер и могут поражать различные ткани и органы человека.
- Лабораторная диагностика проводится подобно той, которая применяется при клостридиальных инфекциях.
- Лечение, в основном, проводят антибиотиками (пенициллин, карбенициллин, хлорамфеникол) и метранидазолом.

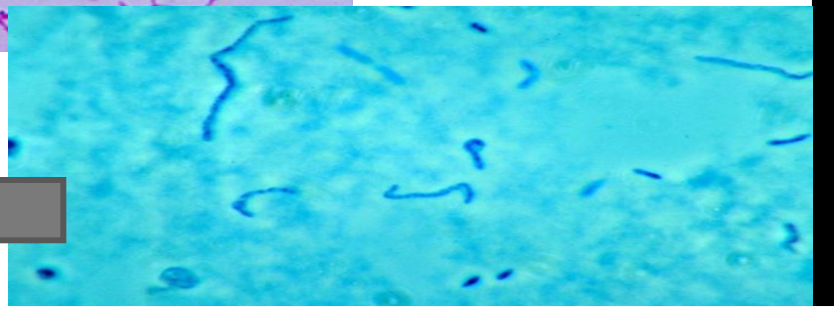
ФУЗОБАКТЕРИИ (род *Fusobacterium*)



Fusobacterium russii



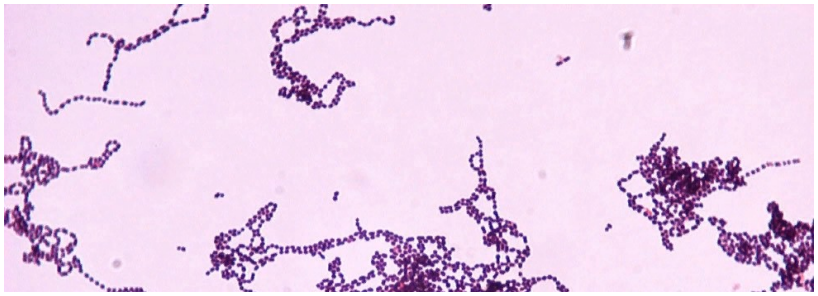
Fusobacterium nucleatum



Fusobacterium necrophorum

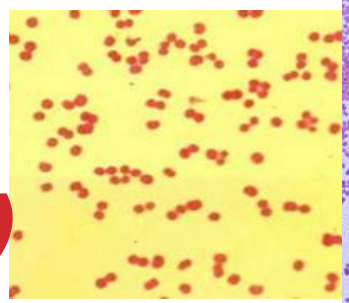
- ✓ **грамотрицательные анаэробные неспорообразующие бактерии**
- ✓ **полиморфны, часто имеют форму толстых, длинных палочек с заостренными концами, размером 0,5–1 на 2–3 мкм**
- ✓ **не имеют жгутиков и не образуют капсул**

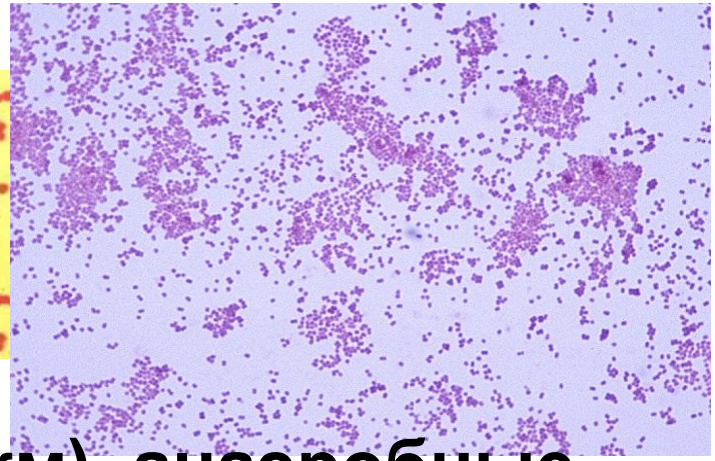
ПЕПТОКОКИ И ПЕПТОСТРЕПТОКОКИ
(роды *Peptococcus, Peptostreptococcus)*



- шаровидные анаэробные бактерии
- неподвижные, спор не образуют
- пептококки по морфологии подобны стафилококкам
- пептострептококки морфологически сходны с стрептококками
- естественными их биотопами является слизистая оболочка рта и носа, кишечник, мочеполовые органы
- могут вызывать аппендицит, плеврит, абсцесс мозга,челюсти, органов таза, брюшной полости, смешанные инфекции
- лечение: метронидазол, тинидазол, факсимин, джозамицин, азитромицин, клиндамицин, моксифлоксацин

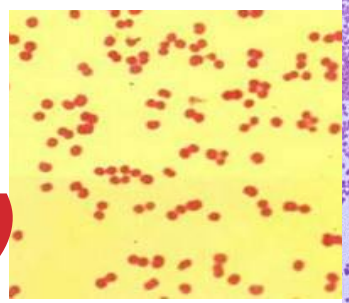
ВЕЙЛОНЕЛЛЫ (род *Veillonella*)

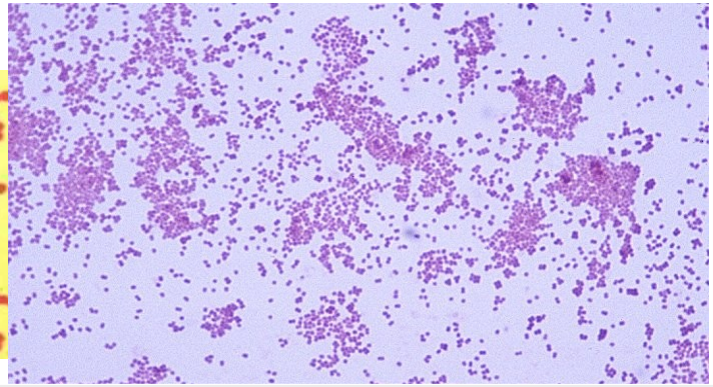




- очень мелкие (0,3-0,6 мкм) анаэробные грамотрицательные кокки
- спор не образуют, жгутиков не имеют
- паразитируют на слизистой оболочке ротовой полости, дыхательных путей и желудочно-кишечного тракта
- при определенных условиях могут повлечь раневые инфекции, абсцессы, сепсис
- лечение проводят АБ

ВЕЙЛОНЕЛЛЫ (род *Veillonella*)





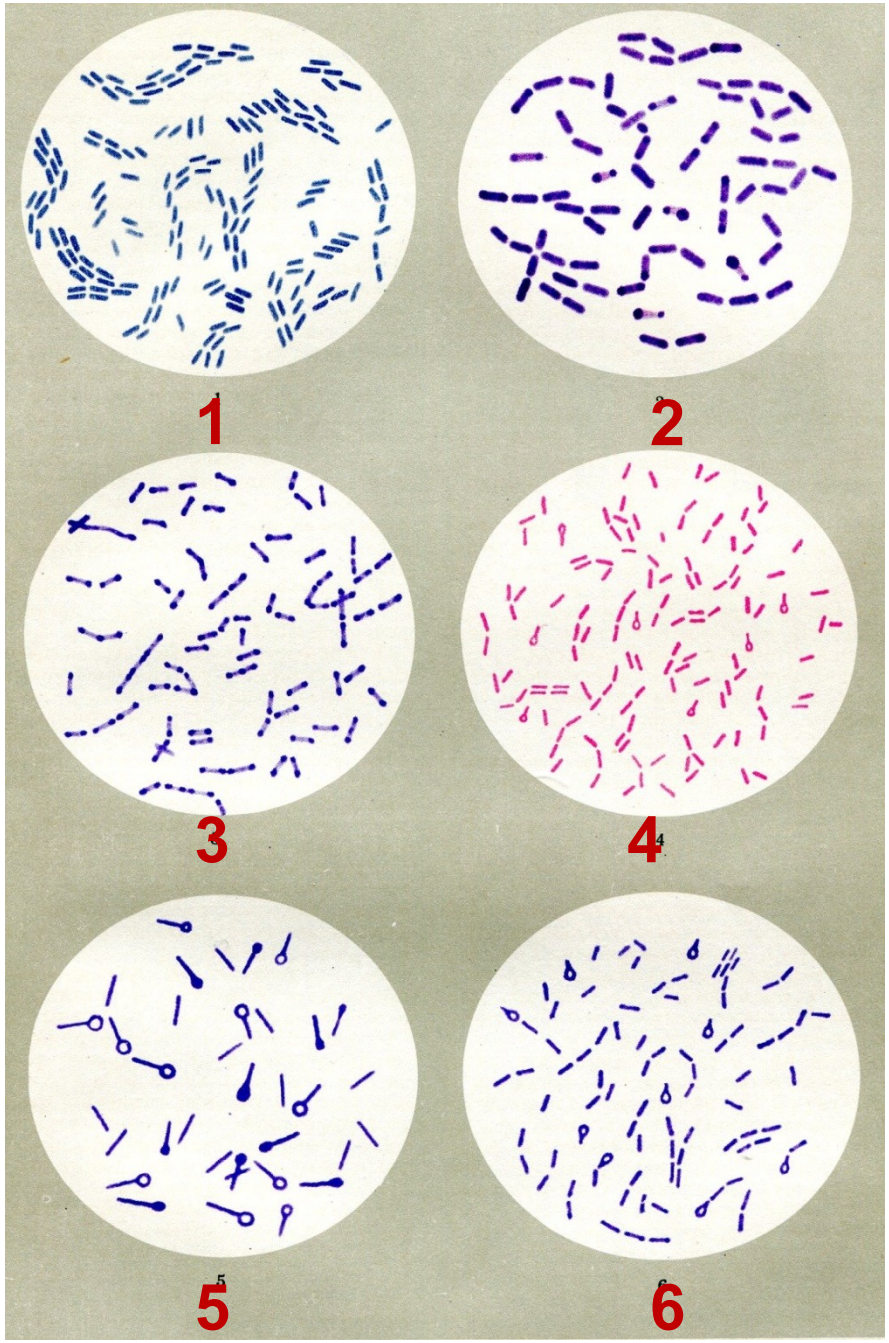
Признак	Характеристика
Питательные среды	Сложные питательные среды с добавлением витаминов группы В, никотиновой кислоты, биотина и др.
Температурные границы роста на питательных средах	20 - 45°С (оптимум 37°С)
Оптимальная pH среды	6,5 – 8,0
Типы колоний: на плотных средах	Колонии 1-3 мм в диаметре, гладкие, непрозрачные, серовато-белые с блестящей поверхностью различной формы: звездчатые, ромбовидные и др.
на жидких средах	Диффузное помутнение среды
Ферментация:	
глюкозы	-
лактозы	-
сахарозы	-
мальтозы	-
маннита	-
Восстановление нитратов в нитриты	+
Разжижение желатина	-
Образование H_2S	+
Образование индола	-
Образование каталазы	-
Образование оксидазы	-
Гемолитическая активность	-

КЛОСТРИДИОЗЫ

- столбняк - вобудитель *C.tetani;*
- ботулизм - *C.botulinum*;
- газовая гангрена - возбудители *C.perfringens A, C.septicum, C.novyi, C.histolyticum* и др.;
- пищевые токсикоинфекции - возбудитель *C.perfringens A*;
- некротические энтероколиты - возбудитель *C.perfringens* типа С и, возможно некоторые др.;
- псевдомембранозный энтероколит - *C.difficile*;
- неспецифические гнойно-септические заболевания (сепсис, абсцессы, пневмонии, омфалиты и пр.).

КЛОСТРИДИИ — НОРМАЛЬНАЯ МИКРОФЛОРА ЧЕЛОВЕКА

- Клостридии обнаруживаются у здоровых людей в кишечнике, в женских половых путях, а также иногда на коже и в ротовой полости.
- Основное место обитания клостридий в человеческом организме — толстая кишка.
- В двенадцатиперстной и тощей кишке клостридии отсутствуют, в подвздошной их популяция в норме составляет 10^2–10^4 КОЕ/мл.
- В кале здоровых людей обнаруживается следующее количество клостридий:
  - дети до года — до 10^3 КОЕ/мл,
  - дети старше года и взрослые до 60 лет — до 10^5 КОЕ/м
  - взрослые старше 60 лет — до 10^6 КОЕ/мл



Возбудители анаэробной инфекции

1 – Clostridium perfringens

2 – Cl. oedematiens

3 – Cl. septicum

4 – Cl. histolyticum

5 – Cl. tetani

6 – Cl. botulinum

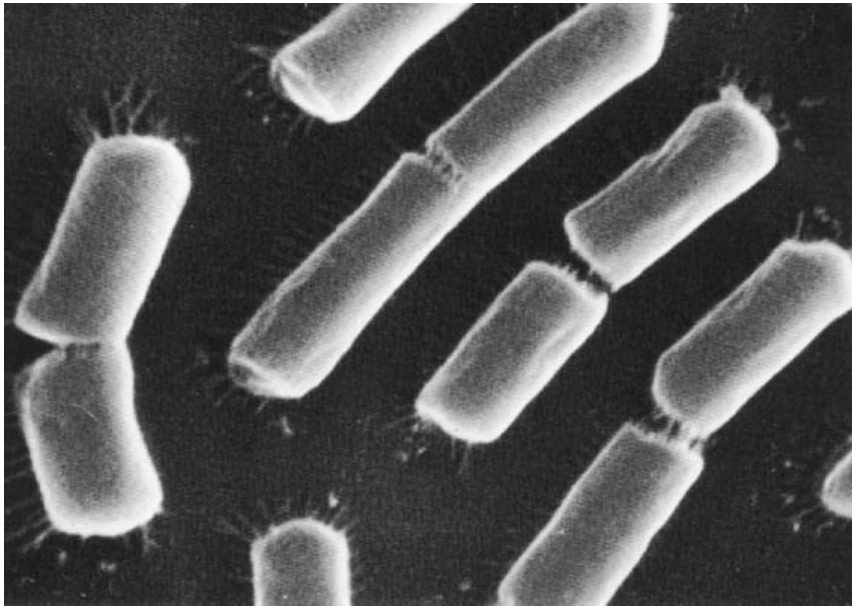
МОРФОЛОГИЯ КЛОСТРИДИЙ

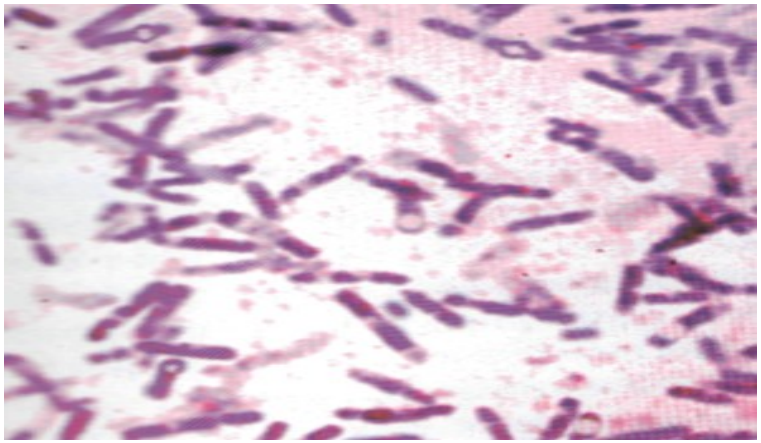
Полиморфные грамположительные палочки;

Овальные крупные споры:
центрально, терминально (на конце палочки),
субтерминально (ближе к одному из концов палочки);

Жгутики (перитрихи).

***C.perfringens* – капсула, жгутиков нет, 6 сероваров (A-F);**





ТОКСИНЫ КЛОСТРИДИЙ

Название	Характеристика	Продуцирующие серовары
альфа-токсин (лецитиназа С)	фермент лецитиназа (фосфолипаза) обладающий гемолитическим, дерматонекротическим и летальным действием за счет разрушения клеточных мембран;	А, возможно, слабо все остальные
бета-токсин	обладает выраженным некротизирующим и кардиотоксическим действием. Основная причина некроза кишечной стенки при некротическом энтероколите;	В, С, F
дельта-токсин	гемолитический летальный фактор, лизирует эритроциты животных, но не человека;	В, С
каппа-токсин	коллагеназа, обладает летальным и некротизирующим действием;	А, С
эпсилон-токсин	летальный, некротизирующий протоксин, активируемый трипсином;	В, D
йота-токсин	летальный, некротизирующий протоксин, активируемый трипсином; -	Е
энтеротоксин	Оказывает диареегенное, летальное и эритемальное действие. Диарея развивается за счет повышения проницаемости капилляров и расширения кровеносных сосудов.	A,C,D

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА АИ

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

Транспортные системы: (обеспечивать сохранение жизнеспособности м/о, причем не мен 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 **Амиеса с активированным углем, тиогликолевая среда, Кари-Блэйра** (доставка: 12-48 часов, от производителя)

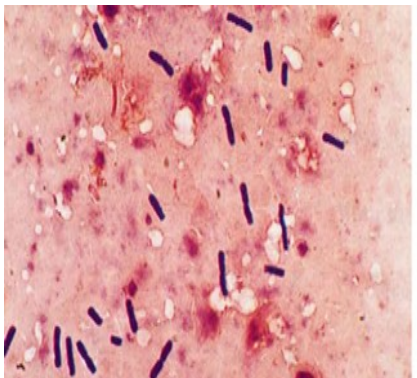
-СКС (высокий столбик) (доставка: 2 часа)

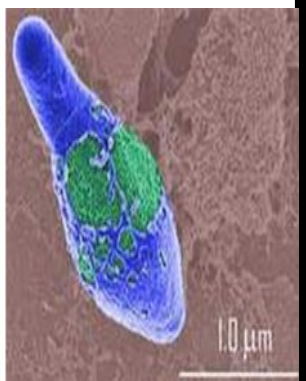
МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ АИ

1. **Бактериоскопический** (мск по Граму, Цилю-Нильсену ,Гинсу-Бурри; РИФ)
2. **Культуральный** (выделение чистой клтуры на КА, среда Вильсон-Блера)
3. **Молекулярно-генетический** (ПЦР)
4. **Серологический** (ИФА, РНГА)

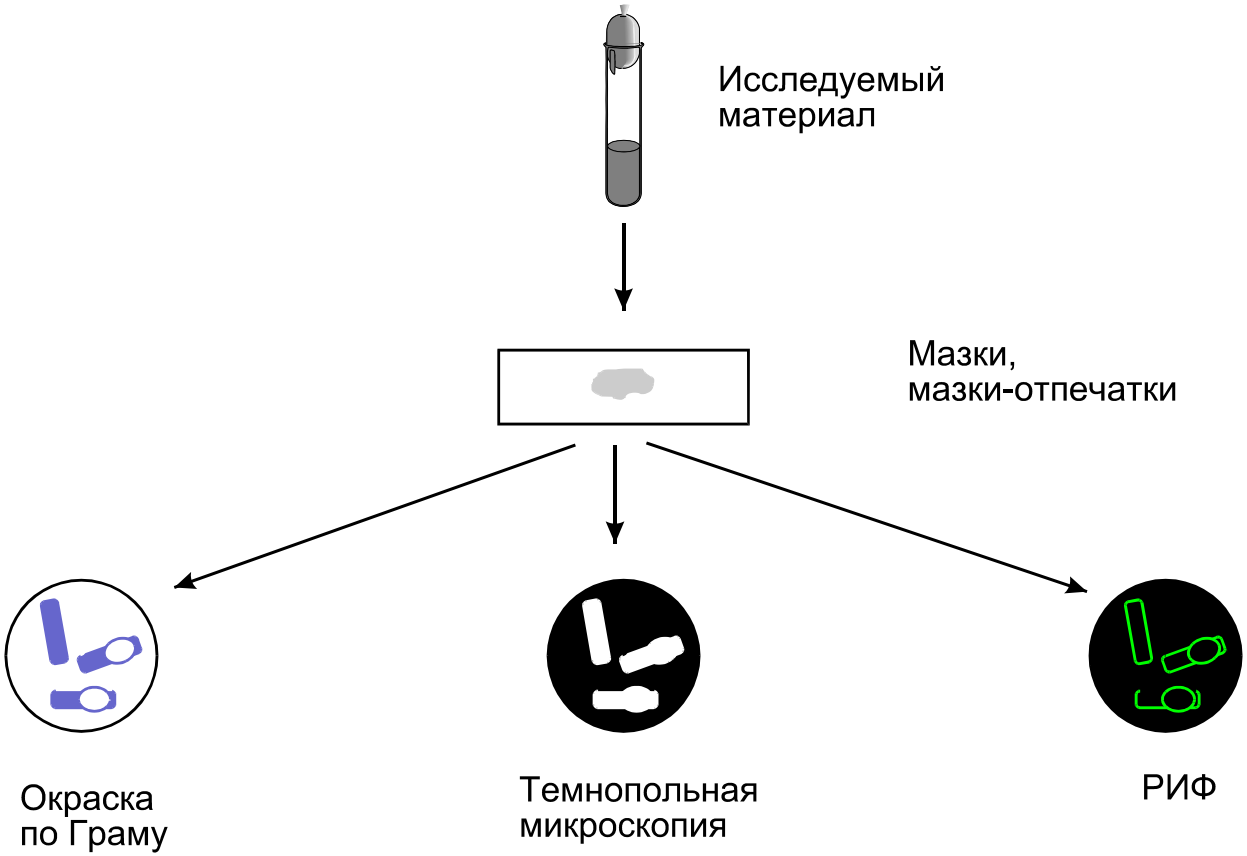
5.Биологический (биопроба на мышах или морских свинках для выявления токсина антитоксической сывороткой в реакции нейтрализации (РН)

метод газожиткостной хроматографии - для обнаружения в материале от больного специфических метаболитов клостридий, включая летучие жирные кислоты с короткой цепью, спирты и нелетучие органические кислоты)





ЭКСПРЕСС-ДИАГНОСТИКА ГАЗОВОЙ ГАНГРЕНЫ



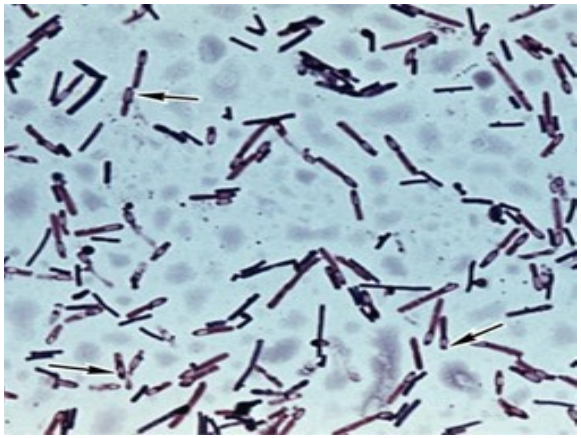
МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ АИ

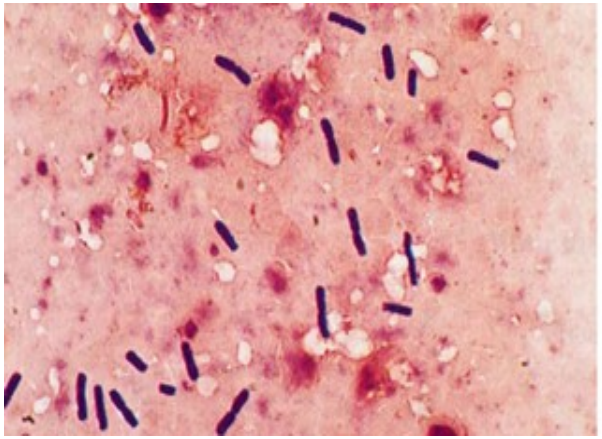
Методы:

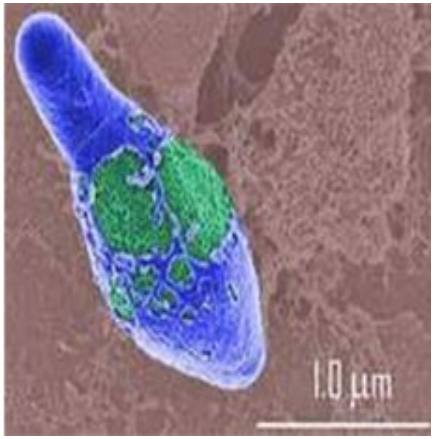
1.Бактериоскопический

при окраске по Граму - обнаружение в препаратах крупных, прямых, грамположительных палочек, образующих капсулы и центрально или субтерминально расположенные споры, **отсутствие лейкоцитов** (при моноинфекции), дает основание поставить предварительный диагноз газовой гангрены.

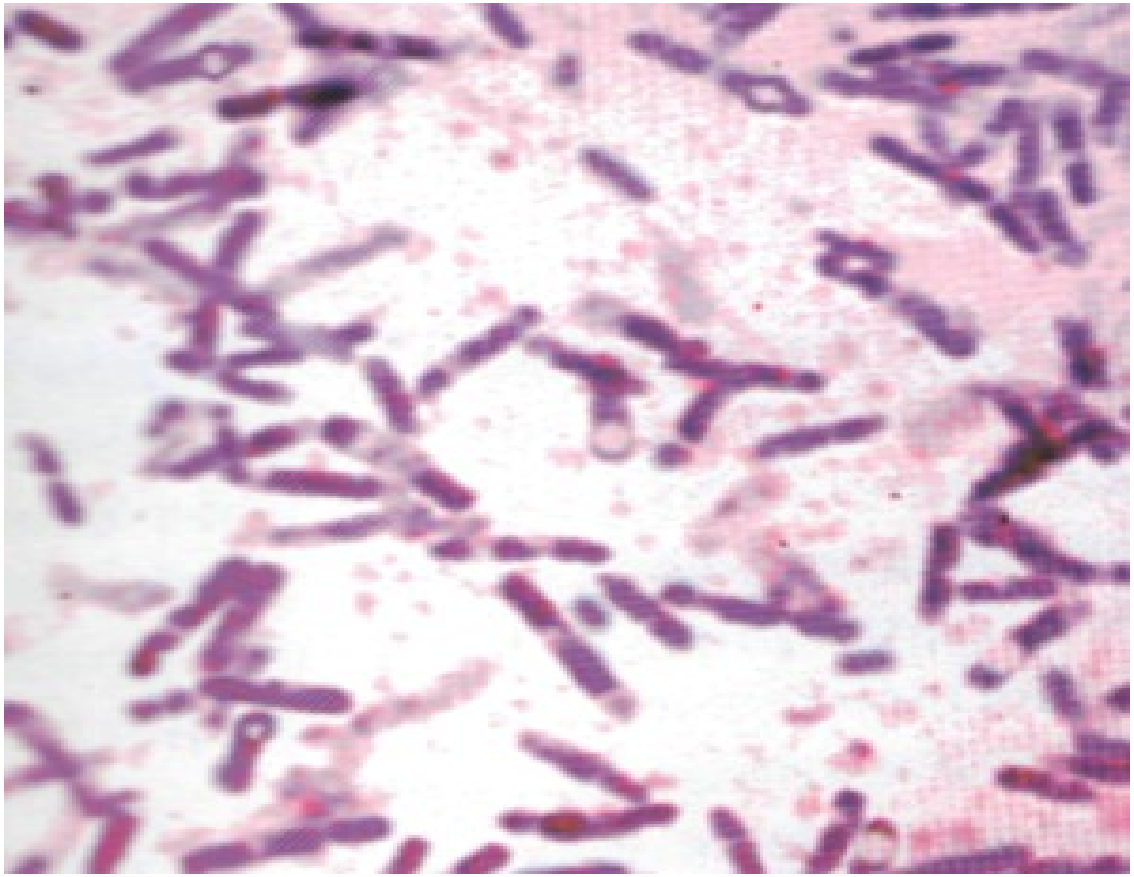
При МСК молодой культуры в первые 6 - 8 ч культуры: грамположительны , старые клетки: грамотрицательными (не воспринимают метиленовый синий).







МАЗОК ИЗ ЧИСТОЙ КУЛЬТУРЫ C. perfringens ОКРАСКА ПО ГРАМУ.

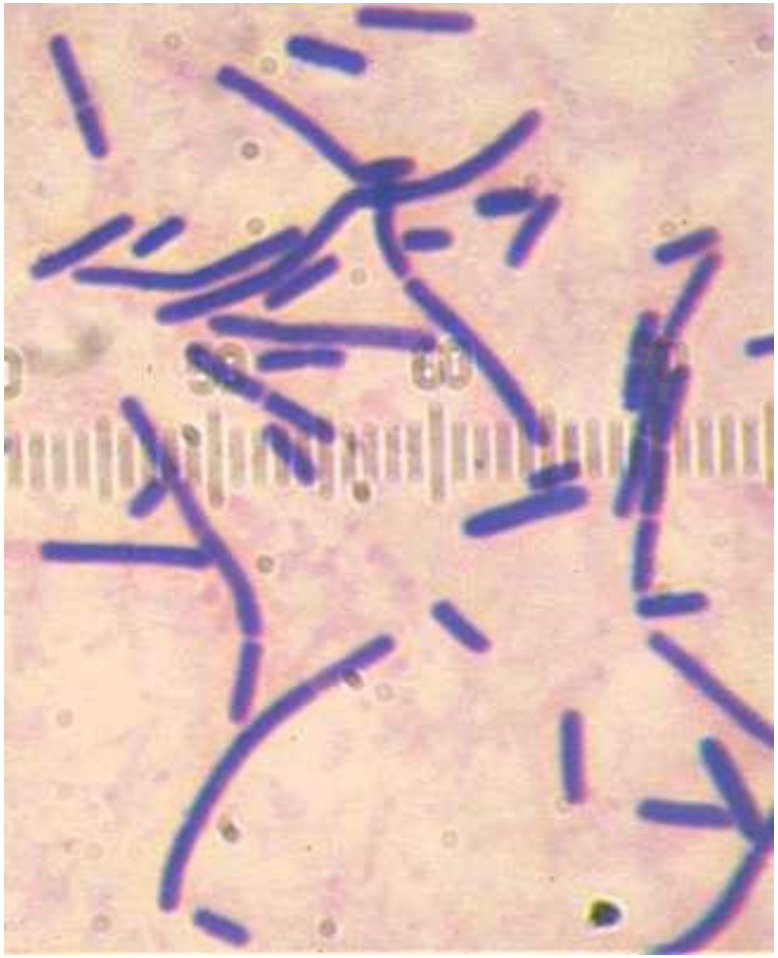


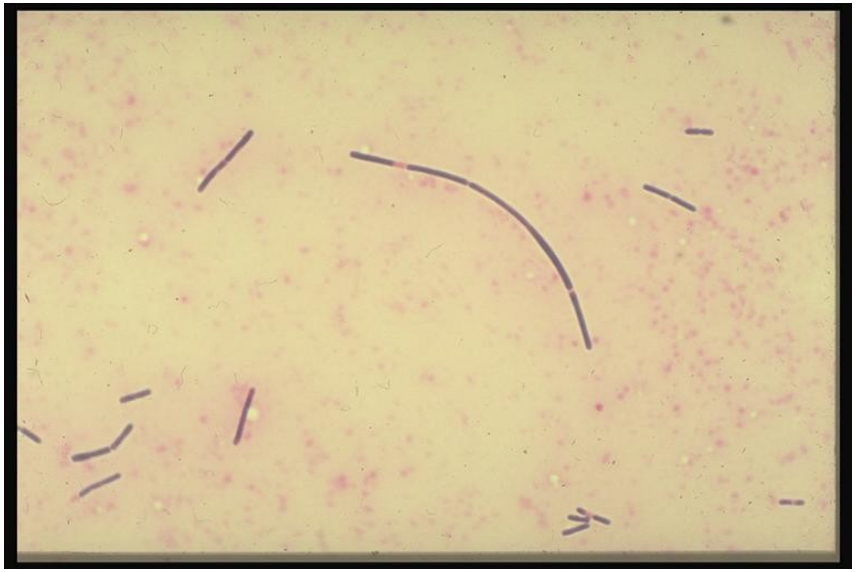
C.novyi

САМЫЕ КРУПНЫЕ, ПРЯМЫЕ ИЛИ СЛЕГКА ИЗОГНУТЫЕ ПАЛОЧКИ

C.septicum

ПОЛИМОРФНЫЕ ПАЛОЧКИ, МОГУТ ОБРАЗОВЫВАТЬ НИТИ

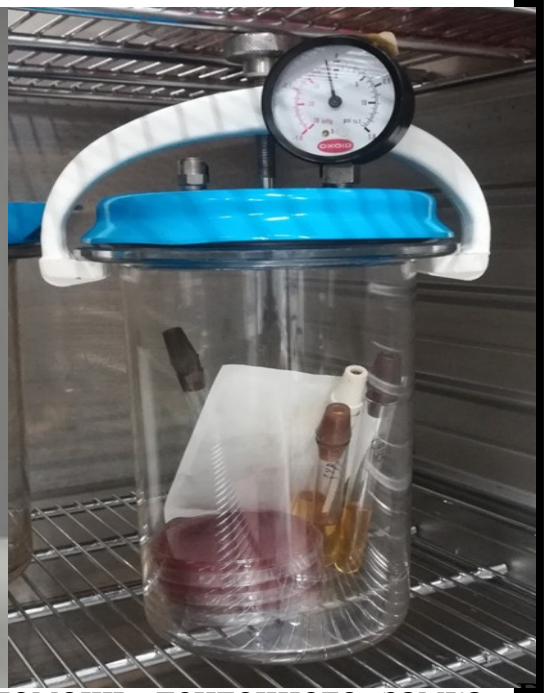




МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ АИ

2. **Культуральный** (выделение чистой клтуры)

2.1 Создание анаэробных условий



Анаэростат – цилиндрическая емкость, герметично закрываемую с помощь ленточного замка. крышке вмонтирован вакуумметр и вентиль для присоединенияисточника газа. Анаэробная сред может создаваться с помощью ГазПак(ов) или через продувку CO2.

GasPak — Системы генерации атмосферы представляют собой быстрый и безопасный способ создания оптимальных ростовых условий для анаэробных, микроаэрофильных и CO2 зависимых организмов. Газогенерирующие пакеты нового поколения не требуют добавления воды ил катализатора. После вскрытия пакета при контакте с воздухом начинается процесс газообразовани

ГАЗОГЕНЕРИРУЮЩИЕ ПАКЕТЫ

Каталитические

- Гидроборид натрия
- Лимонная кислота
- Гидрокарбонат натрия
- Палладиевый катализатор

Безкаталитические

- Аскорбиновая кислота

Анаэробный индикатор (резазурин)

ГАЗОВЫЕ СМЕСИ ДЛЯ АНАЭРОБОВ

- 10% H_2 + 10% CO_2 + 80% N_2
- N_2 или CO_2 или инертные газы с содержанием $O_2 \leq 0{,}01\%$
- CH_4

Создание анаэробных условий.

- Зажженная свеча в закрытой емкости снижает количество кислорода
- Повышенное содержание CO2 стимулирует размножение

- Контейнеры для инкубирования в анаэробных условиях

- Газо-генерирующие системы

- Индикатор «анаэробности»

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°С.

ОСОБЕННОСТИ РАБОТЫ С АНАЭРОБАМИ

- ✓ Используются только свежеприготовленные или регенерированные среды.
- ✓ Анаэростат открывают только перед началом работы.
- ✓ Сначала откол, потом изучение свойств.
- ✓ Посевы сразу убирают в анаэростат.
- ✓ Чашки ставят крышками вверх.

БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА АИ

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 37ºС 2-3 суток

3. Микроскопия мазка по Граму

4. Посев на аэробную и факультативно-анаэробную флору

МР 10-11/7 1986 г.

АНАЭРОБНЫЙ КРОВЯНОЙ АГАР

Основа

Эритрит-агар

Крахмал растворимый

Аммоний сернокислый

Натрия гидрокарбонат

Гемин

Твин-80

Ростовые добавки

5% бараньей или лошадиной крови

Витамин K_1 (менадион)

Селективные добавки

неомицин - 75 мг/л *или*

канамицин - 75 мг/л *или*

гентамицин - 50 мг/л *или*

налидиксовая к-та - 40 мг/л

2-Й ЭТАП

Получение чистой культуры анаэробов.

На этом этапе:

1.Изучить морфологические и культуральные свойства выросших колоний.

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

Дня 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 asaccharolytica-endodontalis, Veillonella spp., Clostridium ramosum

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

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

2 ЭТАП

учет роста на средах *Clostridium*

Цейсслера (АКА)- через 12-18 часов шероховатые, крупные, плоские, сероватые колонии с зоной гемолиза , чаще «двойной» – вокруг колоний полный гемолиз (за счет действия гемолизинов), на отдалении –неполный (за счет действия лецитиназы).

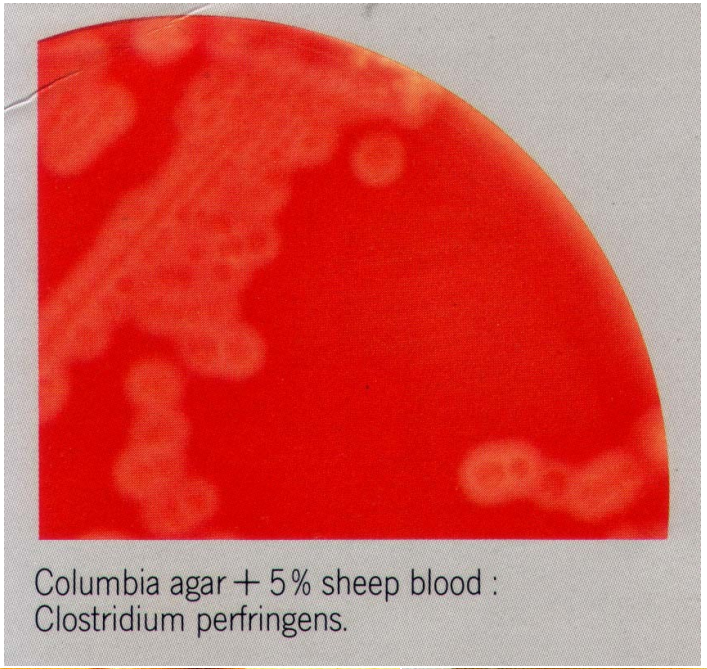
✓ *Clostridium perfringes* типа А - способность менять в аэробных условиях цвет колоний с серовато-белого на зеленовато-оливковый!

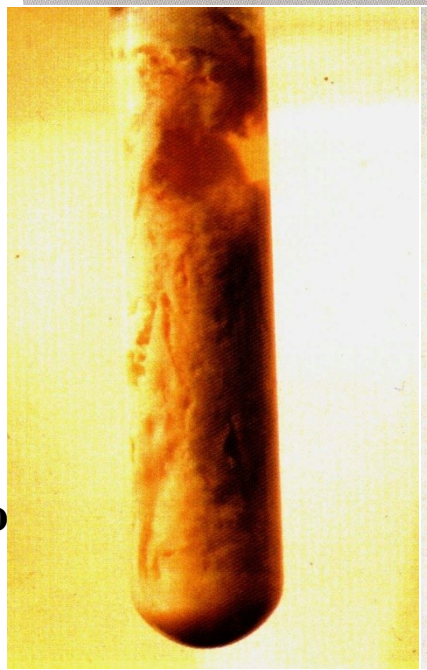
Китта-Тароцци -помутнение и образование газа через 4-8 часов (при 43С первые признаки роста через 1-2 часа);

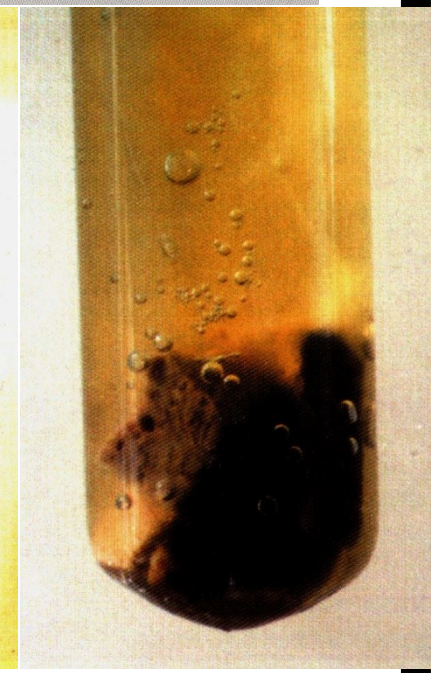
Железо-сульфитный агар - черные колонии в виде чечевичек, дисков, комочков ваты в глубине агара;

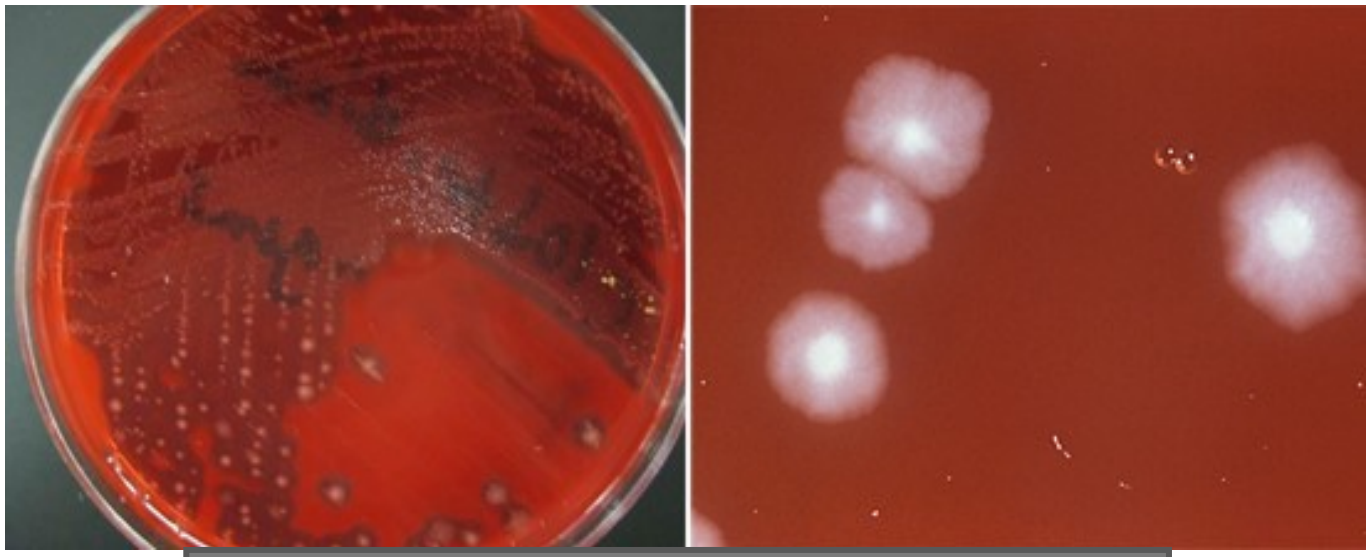
Желточный агар – колонии, окруженные зоной перламутрового преципитата (фосфорилхолин, образующийся из лецитина куриного желтка по действием лецитиназы);

Вильсон-Блера - бурное газообразование

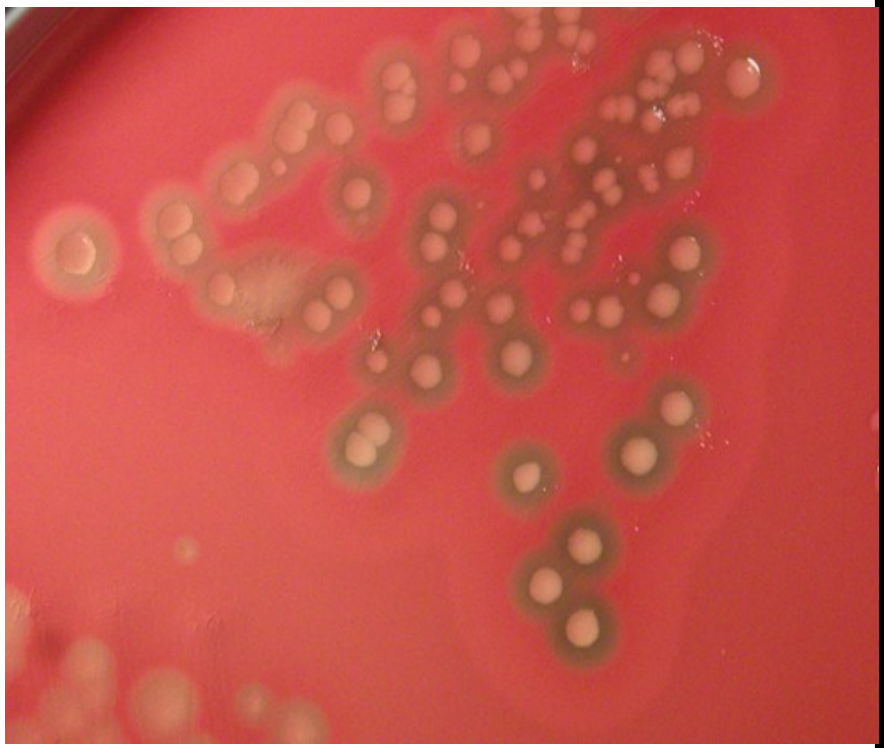

Columbia agar + 5% sheep blood : Clostridium perfringens.







Колонии C. perfringens на кровяном агаре



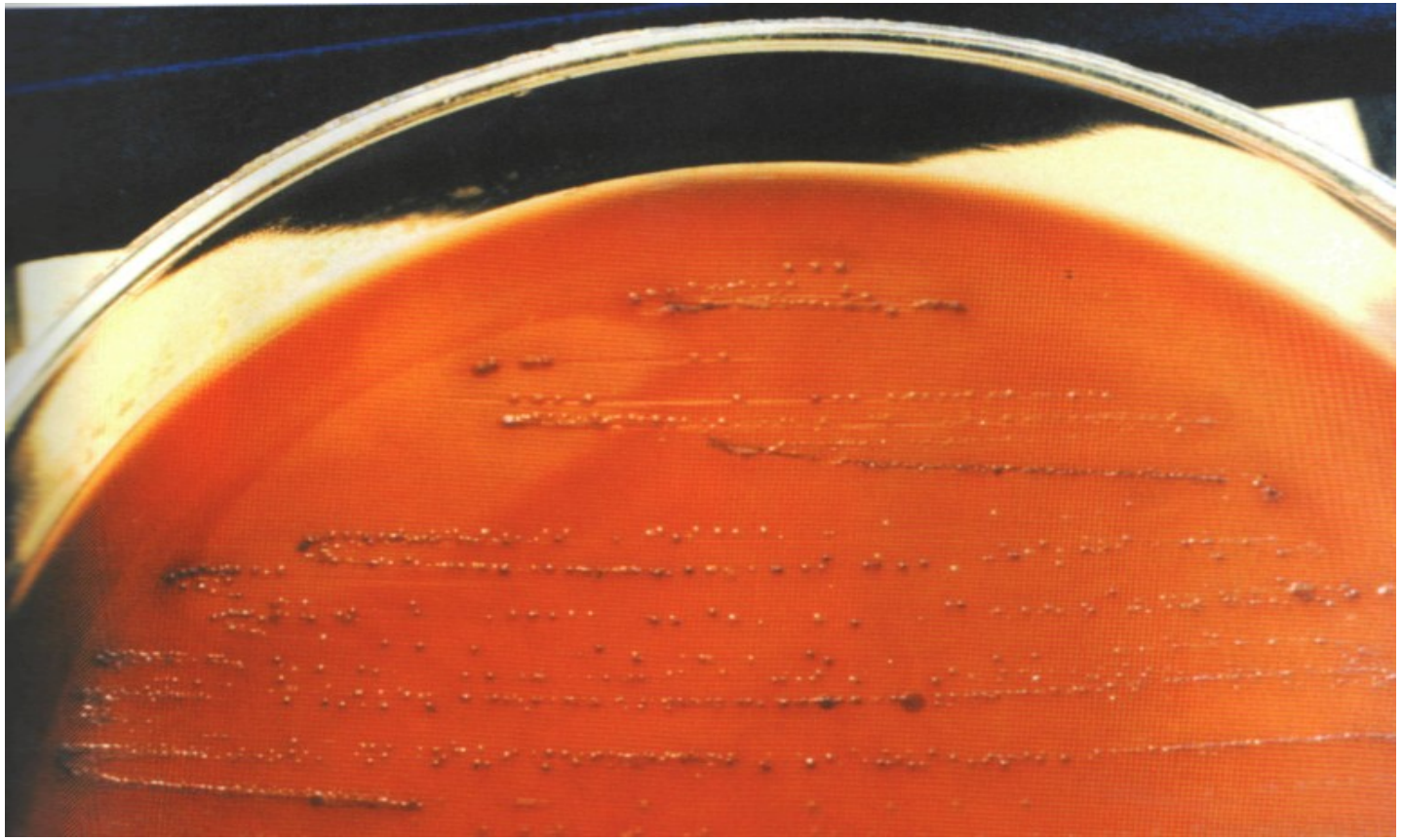
Характерная «двойная зона» гемолиза

КОЛОНИИ *C.perfringens*

Рост ч/з 3-8 часов с бурным газообразованием

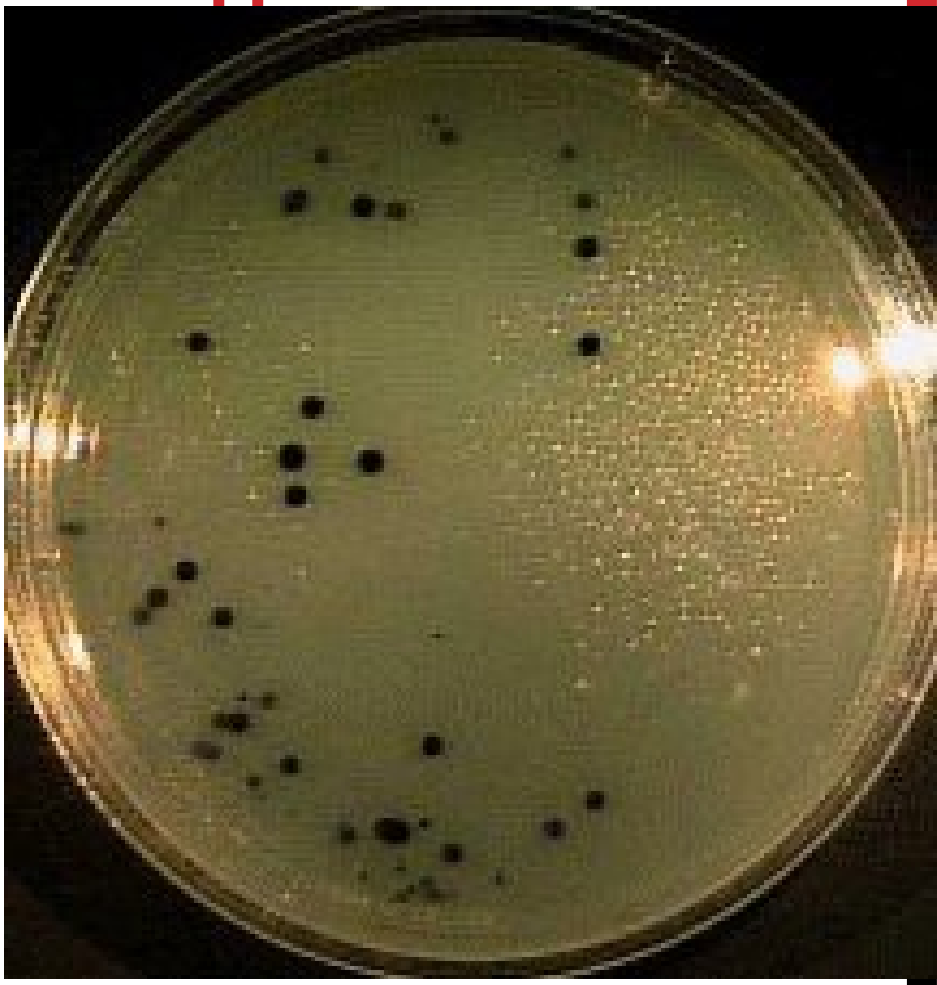
АКА

- **S - гладкие, содержат безкапсульные клетки;**
- **M - слизистые, содержат клетки, имеющие капсулы;**
- **R - шероховатые, образованы длинными, грубыми клетками;**

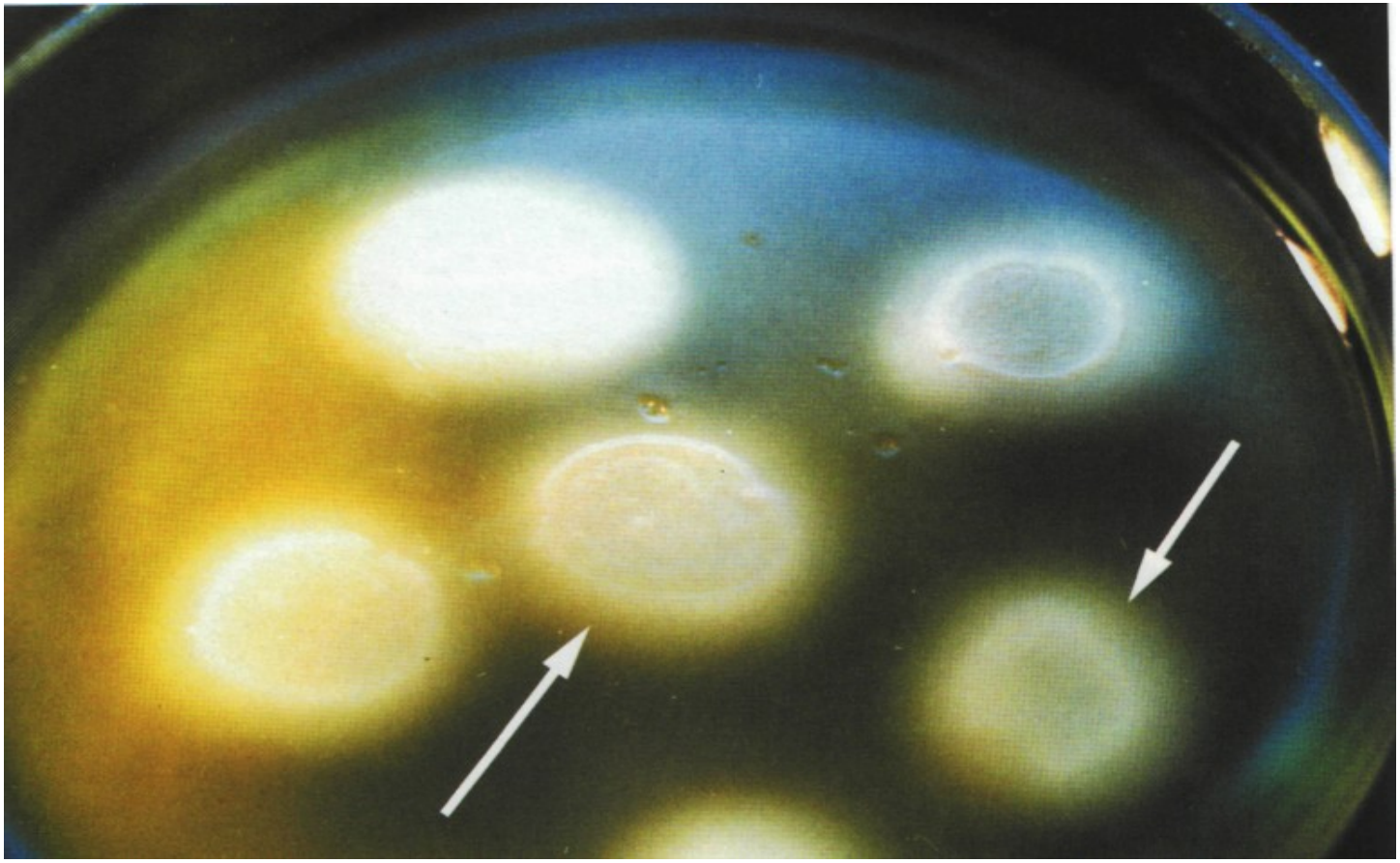


Колонии *C. perfringens* на агаре Цейсслера.
После кратковременного контакта с воздухом серовато-белые колонии приобретают оливковый цвет.

ВЫДЕЛЕНИЕ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР ОБЛИГАТНЫХ АНАЭРОБОВ. ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ.



СРЕДА ВИЛЬСОНА-БЛЕРА (ЖЕЛЕЗО-СУЛЬФИТНЫЙ АГАР) используется для выделения анаэробных бактерий. Готовится из питательного агара, к которому добавляют 1% глюкозы, хлорид железа и сульфит натрия. Анаэробные клостридии ***(Clostridium perfringens)*** **образуют на среде колонии черного цвета за счет образования соединений железа с серой.**



Лецитиназная активность *C. perfringens* на желточном агаре (посев бляшками).

Под действием бактериальной лецитиназы лецитин куриного желтка образует зоны преципитата вокруг колоний (указаны стрелками).после кратковременного контакта с воздухом серовато-белые колонии приобретают оливковый цвет.

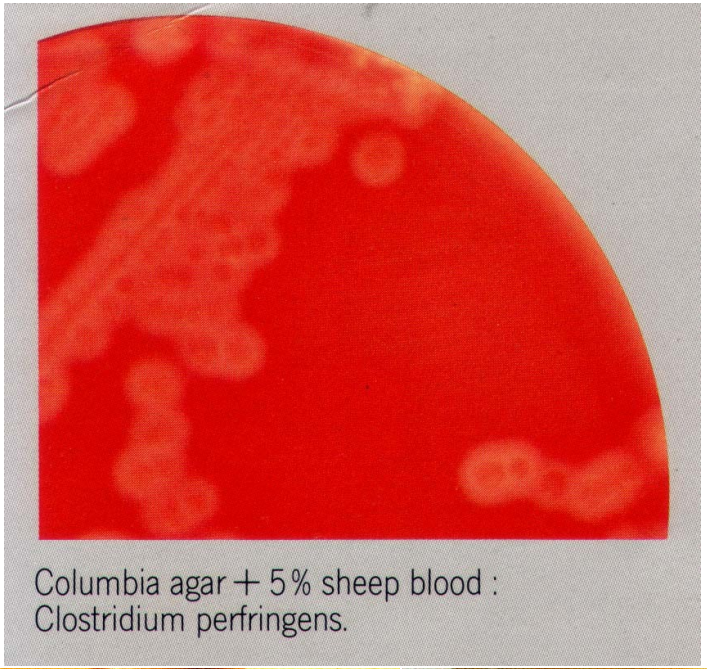
«Штормовая реакция»

(*C. perfringens* интенсивно сворачивают молоко с образованием крупно-ячеистого губчатого сгустка уже через 3часа)

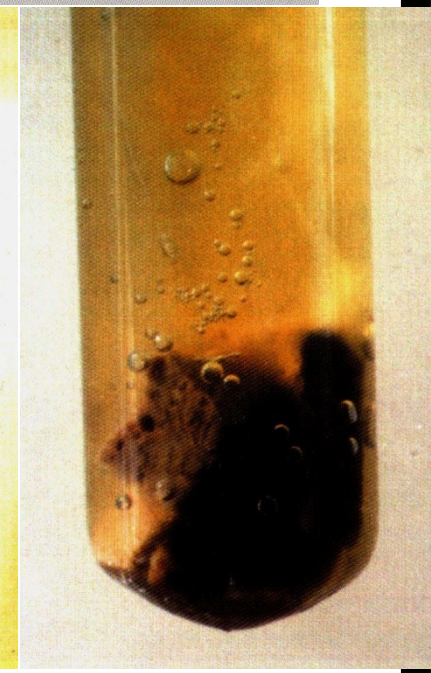
среда Китта-Тароцци

(*C. perfringens* при росте дает помутнение среды, образование пузырьков газа. В среду внесены кусочки печени для поглащения кислорода)

Схема выделения чистой культуры облигатных анаэробов


Columbia agar + 5% sheep blood : Clostridium perfringens.

3 ЭТАП – Проверка чистоты выделенной культуры, пересев на среды «пестрого» ряда с целью определения биохимических свойств, выявление токсинов (биопроба на мышах, морских свинках) и факторов патогенности с целью идентификации выделенной культуры анаэробов.



4 ЭТАП – Интерпретация полученных результатов, определение вида выделенной культуры анаэробов.

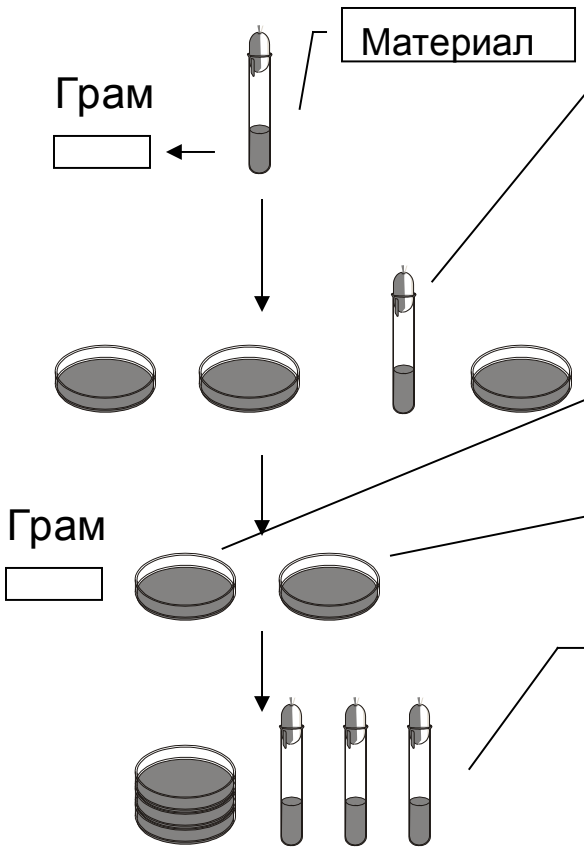
ИДЕНТИФИКАЦИЯ

- ✓ **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**

СХЕМА ИССЛЕДОВАНИЯ



Анаэробный кровяной агар (Цейслера)
Селективный анаэробный кровяной агар
Тиогликолевая среда
Традиционные среды для аэробов

Анаэробный кровяной агар
Анаэробная инкубация

Анаэробный кровяной агар
Аэробная инкубация

Тесты:
ферментация глюкозы,
гидролиз эскулина,
редукция нитратов,
образование индола

Чувствительность к
канамицину
ристомицину
полимиксину
желчи

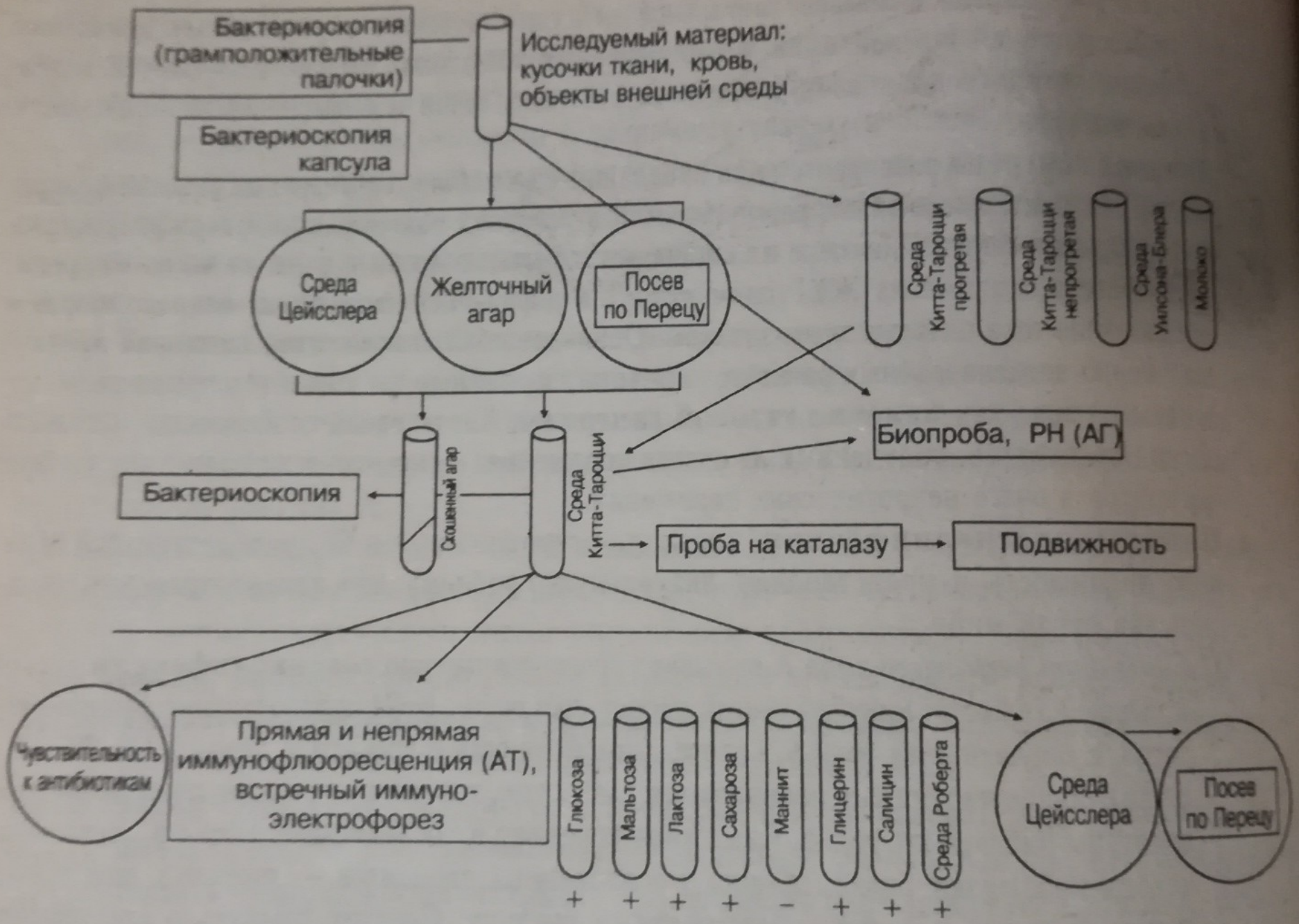


Рис. 8-1. Схема бактериологического исследования на *Clostridium perfringens*

СХЕМА ИССЛЕДОВАНИЯ НА АНАЭРОБНЫЕ М/О

Посев поступившего в лабораторию материала проводят немедленно на свеже разлитые чашки и проредуцированные жидкие среды (кипячение на водяной бане 15 минут)

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

Материал

Микроскопическое исследование

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

В аэробных условиях

КА

сах. бульон

Видовая идентификация

В анаэробных условиях

КА

СКС-199, высокий столбик

Посев в редуцированную среду Китта-Тороцции

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.

Таблица 4. Биологические свойства неспорообразующих и спорообразующих анаэробов

Свойства	Бактерии								
					род *Clostridium*				
	Peptococcus	*Peptostreptococcus*	*Veilonella*	*Bacteroides*	*C.perfringens*	*C.novy*	*C.septicum*	*C.sordelli*	*C.histolyticum*
Морфология	кокки	кокки	кокки	палочки	палочки	палочки	палочки	палочки	палочки
Подвижность	-	-	-	±	-	+	+	+	+
Споры	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Окраска по Граму	+	+	-	-	+	+	+	+	+
Ферментация углеводов	+	+	-	+	+	+	+	+	-
Свертывание молока	-	-	+	+	+	v	-	+	+
Продукция H_2S	+	-	+	±	-	-	-	v	v
Продукция индола	-	-	-	±	-	-	-	-	-
Разжижение желатины	-	-	-	±	+	+	+	+	+
Редукция нитратов	±	-	+	±	±	±	±	-	-
Гемолиз эритроцитов		-	-	±	±	+	+	+	+
Образование токсина	-	-	-	-	+	+	+	+	+

Обозначения: (+) - постоянный признак, (+) - непостоянный признак, (-) – отсутствие признака V- вариабельный признак

Биологические свойства клостридий

Вид микроба	Индол	Мочевина	Гемолиз	Подвижность	Желатина	Газ в Жидкой среде	Гидролиз крахмала	Изменения молока
C. perfingens	-	-	+	-	+	+	+	КГС
C. novyi	-	-	+	+	+	+	-	КСП
C. septicum	-	-	+	+	+	+	-	КС
C. histoliticus	-	-	+	+	+	+	-	П
C. tetani	+	-	+	+	+	?	?	СлабоП
C. botulinum	-	-	+	+	+	+	-	

К- кислота,
С- сгусток
П- пептонизация
Г- газ

Таблица 5. **Биологические свойства основных возбудителей газовой гангрены и столбняка**

Виды клостридий	Капсула	Подвижность	Лецитиназа	Индол	Ферментация		
					лактозы	сахарозы	маннита
Clostridium perfringens	+	-	+	-	+	+	+
Clostridium Novy	-	+	+	-	-	-	-
Clostridium septicum	-	+	–	-	+	-	-
Clostridium Tetani	-	+	–	+	-	-	-

Обозначения: (+) - постоянный признак, (-) – отсутствие признака,

ДИСКИ С АНТИБИОТИКАМИ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ АНАЭРОБОВ

Микроорганизм	***Канамицин,*** *1000 мг*	***Ванкомицин,*** *5 мг*	***Колистин,*** *10 мг*
B.fragilis group	R	R	R
B.ureolyticus group	S	R	S
Fusobacterium spp.	S	R	S
Porphyromonas spp.	R	S	R
Prevotella spp.	R	R	V
Veillonella spp.	S	R	S
Peptostreptococcus anaerobius	R	S	R
Грамположительные анаэробные палочки	V	S	R
Грамположительные анаэробные кокки	S	S	R

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ АНАЭРОБОВ

Микроорганизмы	Пигмент	Канами-цин	Индол	Желчь (рост)	Эскулин	Желатин	Генциан-виолет	Липаза
P.melaninogenicus	+	R	-	-	+	+	S	-
P.intermedius	+	R	+	-	-	+	S	+
P.asaccharolyticus	+	R	+	-	-	+	S	-
Группа B.fragilis	-	R	V	+	+	V	S	-
Другие бактероиды	-	R	-	-	+	V	S	-
B.corrodens	-	S	-	-	-	-	S	-
F.nucleatum	-	S	+	-	-	-	R	-
F.necrophorun	-	S	+	-	-	-	R	+
F.mortiferum	-	S	-	+	+	-	R	-

ХАРАКТЕРИСТИКА НЕПИГМЕНТИРОВАННЫХ БАКТЕРОИДОВ

Микроорганизм	Желчь	Индол	Желатин	Эскулин	Глюкоза	Рамноза	Трегалоза	Маннит	Лактоза
B.fragilis	=Ж	-	-	+	+	-	-	-	+
B.tetaitotaomicron	<Ж	+	-	+	+	+	+	-	+
B.ovatus	>Ж	+	+	+	+	+	+	+	+
B.distasonis	>Ж	-	+	+	+	+	+	-	+
B.vulgaris	>Ж	-	+	-	+	+	-	-	+
B.bivius	-	-	+	-	+	+	-	-	+
B.disiens	-	-	+	-	+	+	-	-	-

ДИАГНОСТИКА АНАЭРОБНОЙ ИНФЕКЦИИ (УПРОЩЕННАЯ СХЕМА)

СКС		СКС с налидиксовой к-той		СКС с канамицином и желчью		Оценка результатов	
Первичный посев	Кровяной агар	Первичный посев	Кровяной агар	Первичный посев	Кровяной агар	Анаэробы	Аэробы
+	-	+	-	+	-	Группа B.fragilis	Отсутствуют
+	+	+	-	+	-		Энтеробактерии
+	+	+	+	+	-		Грам(+) бактерии
+	-	+	-	-	-	Не группы B.fragilis	Отсутствуют
+	+	+	-	-	-		Энтеробактерии
+	+	+	+	-	-		Грам(+) бактерии

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).

Система для культивирования анаэробных, микроаэрофильных и капнофильных бактерий

Anoxomat™ — система для создания анаэробной, микроаэрофильной и капнофильной атмосферы в специальных анаэробных емкостях. Емкости используются многократно, в следствие чего необходимость в расходных материалах отсутствует.

Anoxomat работает при помощи встроенного компьютера и подключается к 1 или 2 баллонам с газовой смесью.

Необходимые условия создаются за 3-5 мин., что делает Anoxomat прекрасной альтернативой газовым пакетам и объемным анаэростатам.

Производитель: Advanced Instruments Inc., США

I. Методические рекомендации

1. **МР «Лабораторная диагностика газовой гангрены и определение чувствительности к антибиотикам возбудителей этого заболевания»** (утв. Минздравом СССР), Москва 1984 г.

2. **Методические рекомендации «Диагностика и комплексное лечение неклостридиальной анаэробной инфекции у травматолого-ортопедических больных» (утв. Минздравом СССР), Москва 1985 г.**

3. **Методические рекомендации «По микробиологической диагностике заболеваний, вызванных неспорообразующими анаэробными бактериями" (утв. Минздравом СССР), Москва 1986 г.**

4. **Методы микробиологического анализа неспорообразующих анаэробных бактерий** (утв. Минздрав РФ), Москва 1996г.

II. Приказ 535

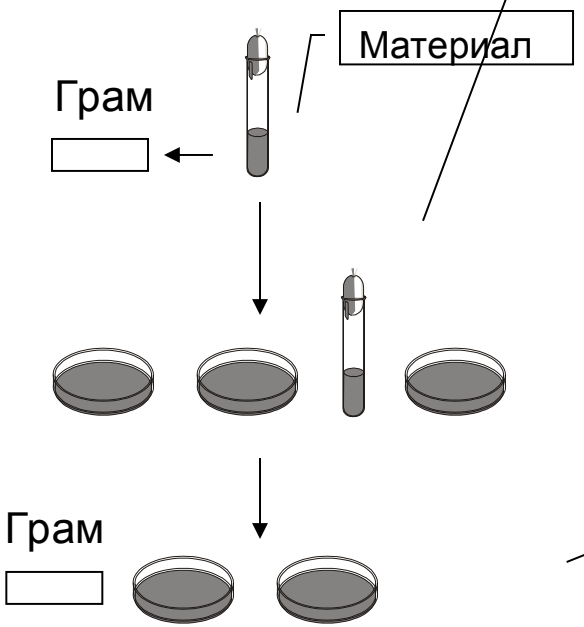
III. Вспомогательная литература

- **Таблицы к лекции «АНАЭРОБНАЯ ИНФЕКЦИЯ»,** Санкт-Петербург 1997г
- **Медицинская микробиология** (под ред. В.И. Покровского (1999г)
- **Клиническая лабораторная аналитика** (под ред.В.В.Меньшикова (2003)
- **Частная медицинская микробиология** (под ред. А.С.Лабинской (2005)

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ

СХЕМА ИССЛЕДОВАНИЯ (USA)



Brucella agar (BBA) –КА для бруцелл
Phenylethyl alcohol (PEA) - Фенилэтиловый спирт

Bacteroides bile esculin (BBE) –желчь, эскулин

Laked kanamycin vancomycin (LKV) - лакированный канамицин, ванкомицин

Enriched thioglycollate broth - обогащенный тиогликолятный бульон

Традиционные среды для аэробов

Blood agar с дисками (КА)
Канамицин – 1000 mg
Ванкомицин – 5 mg
Колистин – 10 mg
Анаэробная инкубация

Шоколадный агар
Инкубация с CO_2

СРЕДЫ ДЛЯ ПЕРВИЧНОГО ПОСЕВА (USA)

Среды	Рост	Ингибирование
Brucella blood agar (BBA)	Все микроорганизмы	Нет
Phenylethyl alcohol (PEA)	Все анаэробы	Факультативно анаэробные грамотрицательные палочки
Bacteroides bile esculin (BBE)	B.fragilis group, некоторые фузобактерии	Большинство микроорганизмов
Laked kanamycin vancomycin (LKV)	Бактероиды, некоторые фузобактерии	Все грамположительные, факультативно анаэробные грамотрицательные палочки
Enriched thioglycollate broth	Все микроорганизмы	Нет

БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА АИ

1 ЭТАП

1. Посев материала методом истощающего штриха на:

– анаэробный кровяной агар;

– анаэробный кровяной агар с антибиотиками

– обогащенная СКС

2. Инкубация в анаэростате 37 оС 2-7 суток

3. Микроскопия мазка по Граму

4. Посев на аэробную и факультативно-анаэробную флору

МР 10-11/7 1986 г.

МЕТОДЫ ВЫЯВЛЕНИЯ ТОКСИНА C.DIFFICILE

- по цитопатогенному специфическому эффекту в культуре человеческих легочных фибробластов, который может быть нейтрализован антитоксином к C.sordellii или к C.difficile;
- иммуноферментным методом или методом встречного иммуноэлектрофореза. Эти методы менее чувствительны и специфичны по сравнению с тестом на культуре тканей;
- иммунохроматографическим методом.

КРИТЕРИИ ДИАГНОСТИКИ

- клиническая картина колита;
- присутствие токсина в фекалиях больного.
- наличие в слизистой толстой кишки псевдомембран слизиево-лейкоцитарной структуры, внешне похожих на фибринозные мембраны при дифтерии.

2 ЭТАП

1. Просмотр колоний под бинокулярной лупой
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 asaccharolytica-endodontalis, Veillonella spp., Clostridium ramosum
- ✓ **розовое** - бактероиды, стрептококки, стафилококки
- ✓ **зеленое** - Clostridium difficile, Clostridium innocuum, Fusobacterium spp.

3 ЭТАП

- Учет роста на секторах
- Выдача ориентировочного ответа о наличии анаэробов
- Посев для идентификации на:

– 5% кровяной агар (инкубируют в свечном сосуде)

– СКС с бромтимолблау (ферм. глюкозы) и бумажкой на индол (инкубируют аэробно)

– СКС (для сохранения культуры)

– анаэробный кровяной агар с дисками

– среду с желатиной

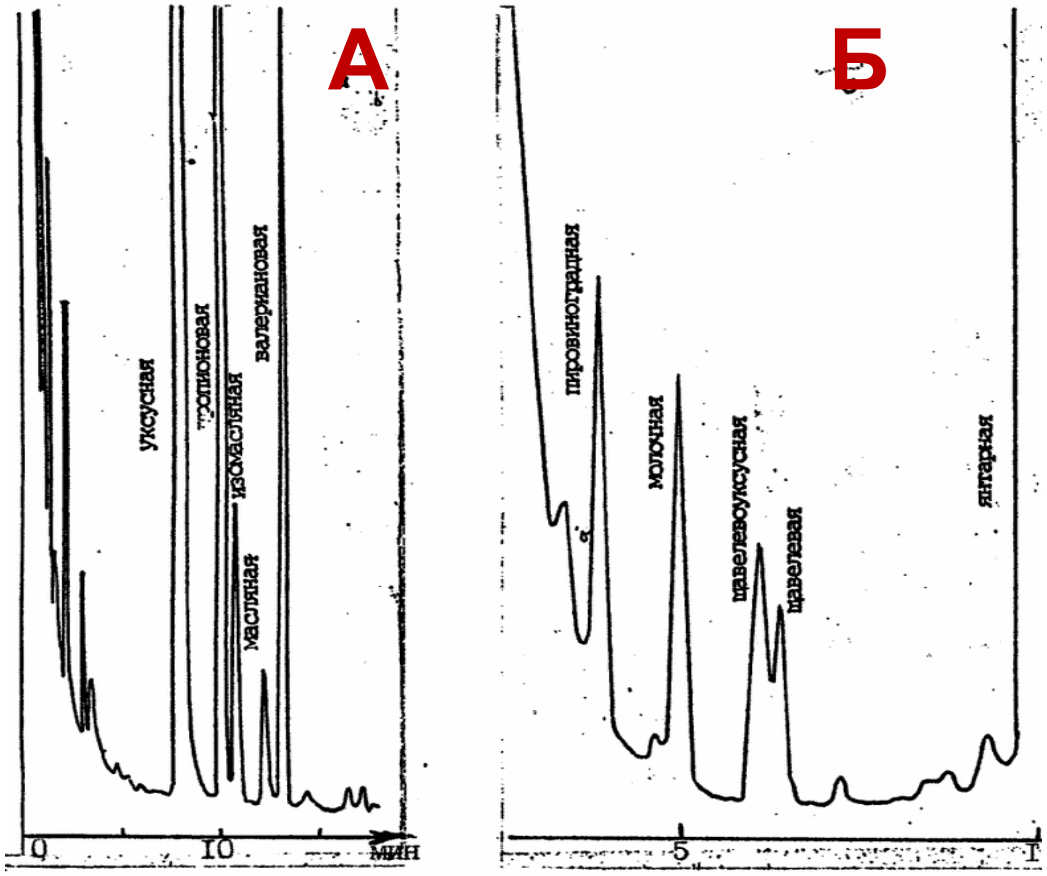
– желточный агар

- Изучение морфологических, тинкториальных культуральных свойств

ТОКСИНЫ *C.difficile*

- Энтеротоксин или токсин А;
- Цитотоксин или токсин В;
- Токсин, повышающий сократительную активность мышц толстого кишечника.

ХРОМАТОГРАММА ЧИСТОЙ КУЛЬТУРЫ B.FRAGILIS



А – хроматограмма летучих жирных кислот (ЛЖК)

Б – дополнительная уточняющая информация при определении нелетучих жирных кислот (НЭЖК), ароматических кислот и аминов

МИНУСЫ ГЖХ ПРИ ДИАГНОСТИКЕ АНАЭРОБНЫХ И АЭРОБНО-АНАЭРОБНЫХ ИНФЕКЦИЙ

- Наличие в пробе анаэробов не, продуцирующих ЛЖК (Bacteroides corridens, Peptococcus magnus, Peptostreptococcus intermedius)
- Низкая продукция ЛЖК (B.fragilis в случае моноинфекции)
- Сильное разведение клинического материала (перитонеальная жидкость)
- Присутствие в пробе аэробов, утилизирующих ЛЖК, выделяемых анаэробами (P.aeruginosa)
- Присутствие в пробе S.aureus или E.coli, продуцирующих сходные с анаэробами ЛЖК

КОНЦЕНТРАЦИЯ АНТИБИОТИКОВ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ МЕТОДА ЭЛЮЦИИ С ДИСКА

Препарат	Содержание препарата в диске, мкг	Количество дисков на 5 мл среды	Конечная концентрация антибиотика, мкг/мл
Пенициллин G	6 (10 ЕД)	1	1,2 (2 ЕД)
Ампициллин	10	2	4
Карбенициллин	100	3	60
Цефалексин	30	2	12
Левомицетин	30	2	12
Тетрациклин	30	1	6

Таблица 16-3. Дифференциальные признаки бактерий рода *Prevotella*

Вид	Гидролиз желатина	Гидролиз эскулина	Гидролиз крахмала	Пигменто-образование*	Образование кислоты при ферментации:			
					рамнозы	глюкозы	лактозы	сахарозы
P. melaninogenica	+	± слабо	+	коричневый	–	+	+	+
P. intermedia	+	–	± слабо	коричневый	–	+	–	+
P. loescheii	+	+	+	± (коричневый)	–	+	+	+
P. denticola	+	+	+	± (коричневый)	–	+	+	+
P. bivia	+	–	+	–	–	+	+	–
P. disiens	+	–	+	–	–	+	–	–
P. oralis	+	+	+	–	±	+	+	+
P. buccalis	–	+	–	–	–	+	+	+
P. veroralis	–	+	+	–	–	+	+	+
P. corporis	+	–	+	коричневый	–	–	–	–
P. oulora	–	+	–	–	–	+	+	+

* Пигментообразование определяют на КА (лучше с кровью кролика).

Таблица 16-4. Дифференциальные признаки некоторых бактерий рода *Fusobacterium*

Вид	Гидролиз гиппурата	Индол	Образование H_2S	Гемолиз	Образование кислоты при ферментации:				
					глюкозы	маннозы	мальтозы	сахарозы	салицина
F. nucleatum	±	+	±	± (β-)	±	–	–	–	–
F. mortiferum	±	–	+	–	±	±	±	–	–
F. necrogenes	–	–	+	± (β-)	±	±	–	±	±
F. necrophorum	–	+	+	+ (α-, β-)	±	–	–	–	–
F. periodonticum	+	+	+	–	+	–	–	–	–
F. prausnitzii	+	–	+	–	±	±	±	±	±
F. ulcerans	–	–	–	–	+	–	–	–	–

аблица 16-2. Основные дифференциальные признаки некоторых бактерий рода *Bacteroides*

Вид	Образование индола	Гидролиз желатина	Гидролиз эскулина	Образование H_2S	Образование кислоты при ферментации:			
					рамнозы	глюкозы	лактозы	сахарозы
B. fragilis	–	± слабо	+	+	–	+	+	+
B. thetaiotaomicron	+	± слабо	+	+	+	+	+	+
B. vulgatus	–	+	+	+	+	+	+	+
B. distasonis	–	± слабо	+	+	±	+	+	+
B. uniformis	+	–	+	?	–	+	+	+
B. caccae	–	± слабо	+	–	±	+	+	+
B. ovatus	+	± слабо	+	+	+	+	+	+
B. merdae	–	± слабо	+	+	+	+	+	+
B. stercoris	+	–	+	?	+	+	+	+
B. ureolyticus	–	±	–	+	–	–	–	–
B. gracilis	–	–	–	+	–	–	–	–

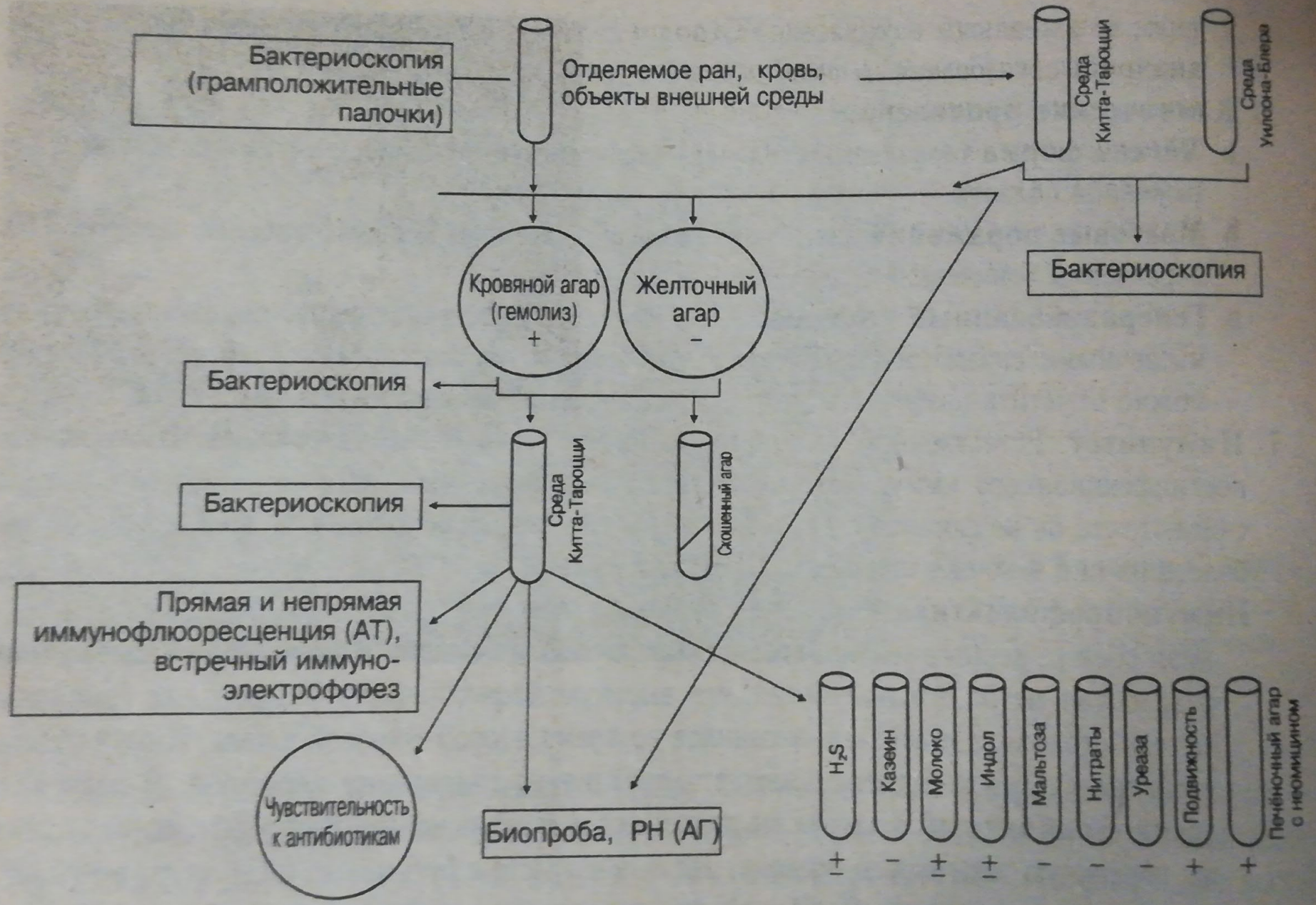


Рис. 8-4. Схема бактериологической идентификации *Clostridium tetani*

ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ АНАЭРОБОВ

Индуцибельные ферменты – инкубация в анаэробных условиях

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

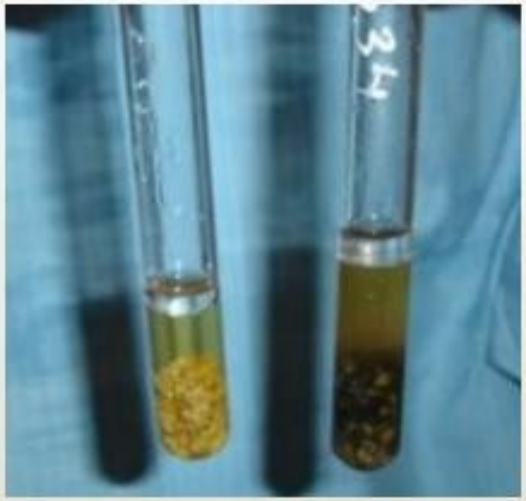
Конститутивные (пресинтезированные) ферменты – инкубация в аэробных условиях

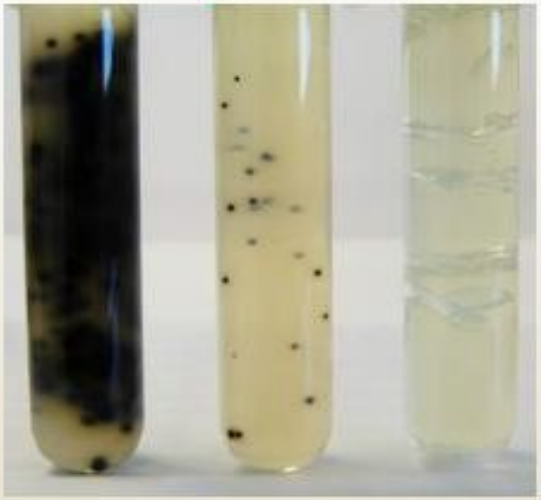
- AN-Ident
- RapID-ANA

РОЛЬ *C.perfringens* В ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ

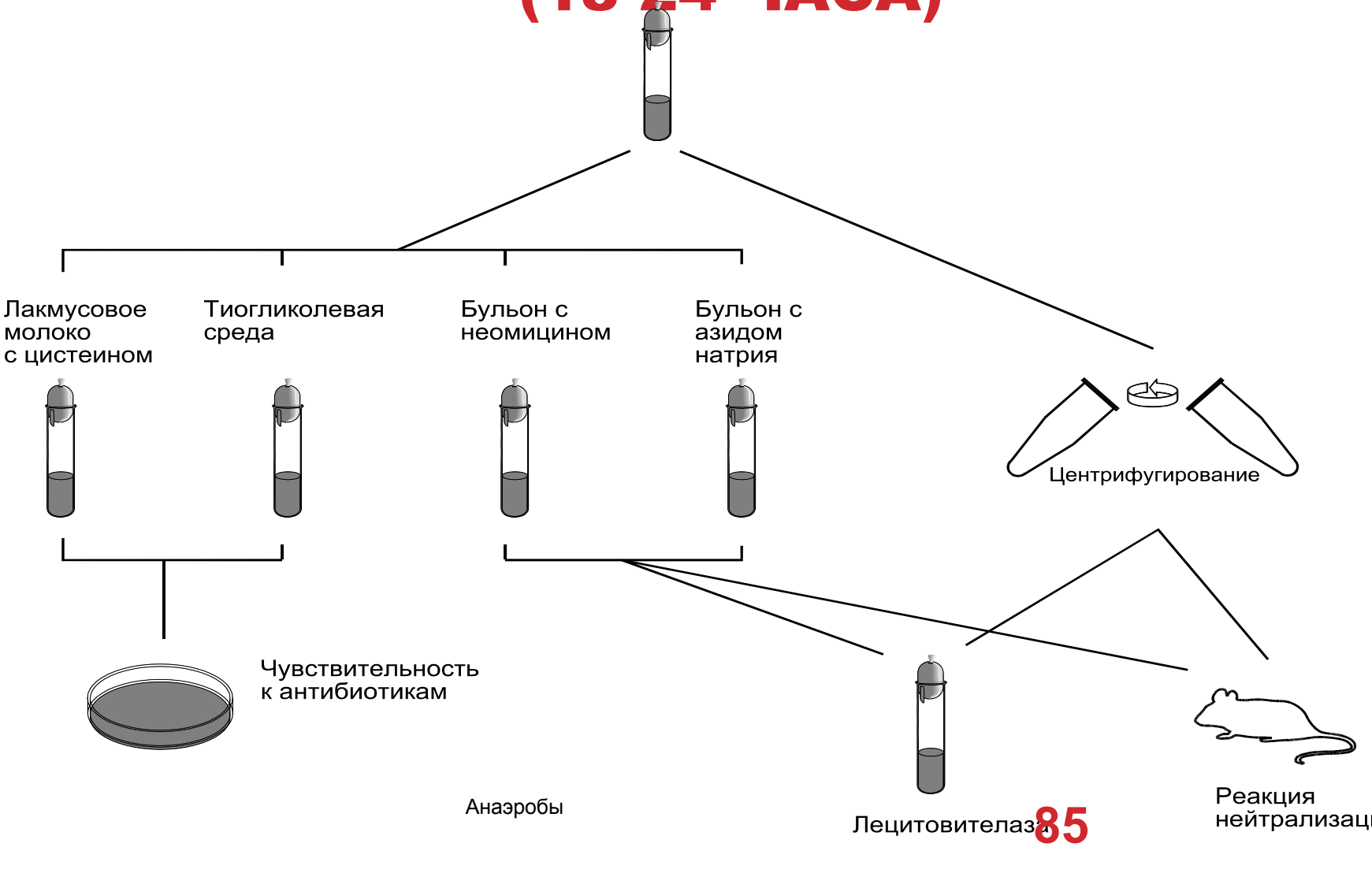
Серо-вар	Роль в патологии		Главные типы токсинов и ферментов
	человека	животных	
A	газовая гангрена, пищевые токсикоинфекции	газовая гангрена	альфа, каппа, гиалуронидаза, энтеротоксин
B	некротический энтероколит	дизентерия ягнят, козлят, жеребят, энтеротоксемия овец и коз.	бета, эпсилон, гиалуронидаза.
C	некротический энтероко-лит, пищевые токсикоинфекции	геморрагическая энтеро-токсемия овец, коз, поро-сят, телят.	бета, каппа, энтеротоксин
D	энтеротоксемия, пищевые токсикоинфекции	энтеротоксемия овец, коз, кроликов, телят, "травяная болезнь" лошадей	эпсилон, энтеротоксин
E		энтеротоксемия ягнят и телят	йота
F	некротический энтероколит		бета

Создание анаэробных условий





- Кислород удаляется при **кипячении** жидкой питательной среды вследствие снижения его растворимости в воде.
- После посева поверхность среды заливается вазелиновым маслом или парафином для предотвращения попадания кислорода в ходе инкубации.

- **Посев в высокий столбик** полужидкой или плотной питательной среды
- Можно культивировать сравнительно нетребовательные к анаэробным условиям микроорганизмы (например, некоторых представителей родов *Clostridium* и *Bifidobacterium*).

УСКОРЕННАЯ ДИАГНОСТИКА ГАЗОВОЙ ГАНГРЕНЫ (18-24 ЧАСА)