**Занятие 2**

**Микробиологическая диагностика заболеваний, вызываемых грам-отрицательными кокками (менингококки, гонококки) и условно-патогенными бактериями (клебсиелла, протей, ацинетобактер, синегнойная палочка)**

**Классификация грамотрицательных кокков:**

Семейство: *Neisseriaceae*

Род: ***Neisseria***

Вид: *N.meningitidis, N.gonorrhoeae* (патогенные)

N.lactamica, N.sicca, N.subflava, N.cinerea, N.mucoza - представители нормофлоры верхних дыхательных путей , условно-патогенные.

**Морфобиологические особенности:**

***Neisseria meningitidis*** – грамотрицательные диплококки бобовидной формы размером 0.6-1.0 мкм, вогнутые поверхности которых соприкасаются друг с другом. Неподвижны, спор не образуют. Клинические изоляты образуют капсулу, которая утрачивается при росте на питательных средах.

**Культуральные свойства Neisseria meningitidis.**

Растут на плотных питательных средах с добавлением нативных белков (сыворотка, кровь, яичный белок), образуют **нежные полупрозрачные округлые мелкие колонии диаметром**  2-3 мм . На кровяном агаре не дают гемолиза. Kaпнофилы. На жидких **питательных средах (сывороточном бульоне) образуют помутнение и небольшой осадок**

**Ферментативная активность** слабая. Расщепляет глюкозу и мальтозу с образованием кислоты. Не обладает протеолитической активностью - не растворяет желатин, не образует индол и сероводород, не восстанавливает нитраты. Оксидаза положительна, каталаза отрицательна.

|  |  |
| --- | --- |
| ***Свойства*** | ***N.meningitidis*** |
| ***Глюкоза*** | ***+***  *(до кислоты)* |
| ***Мальтоза*** | ***+*** *(до кислоты)* |
| ***Желатин*** | ***-*** |
| ***Индол*** | ***-*** |
| ***Сероводород*** | ***-*** |
| ***Нитраты*** | ***-*** |
| ***Oксидаза*** | ***+*** |
| ***Kаталаза*** | ***+*** |

**Антигенная структура Neisseria meningitidis.** По **кaпсульным** антигенам различают 13 серогрупп менингококков. Наибольшее значение в патологии человека имеют серогруппы A,B, C, Y и W135 . Менингококки серогруппы A характеризуются высокой вирулентностью, которая связана с их высокой инвазивной активностью.

**Факторы патогенности.**

* капсула (защищает менингококки от фагоцитоза)
* эндотоксин (менингококковый ЛПС не содержит О-специфического полисахаридного фрагмента. Это усиливает токсичность менингококкового ЛПС)
* пили (обеспечивает адгезию бактерий к слизистой оболочке носоглотки и даже к оболочкам головного мозга)
* IgA-протеаза (защищает бактерию от воздействия фермента, расщепляя молекулу IgA в шарнирной части)

**Эпидемиология:**

Источник инфекции – больной человек или бактерионоситель

Механизм передачи- аэрогенный, путь – воздушно-капельный

**Менингококковые инфекции:**

* Менингококковое носительство
* острый назофарингит
* Менингококцемия
* гнойный (эпидемический) цереброспинальный менингит

**Клинические симптомы эпидемического цереброспинального менингита:**

* высокая лихорадка
* головная боль
* ригидность мышц шеи
* рвота
* высыпания

**Иммунитет**

* Иммунитет против менингококковой инфекции связан с наличием в сыворотке крови антител с бактерицидным действием.
* После генерализованной инфекции формируется стойкий иммунитет и рецидивов заболевания не наблюдается.

**Методы микробиологической диагностики менингококковых инфекций**

***Материалы для исследования:***

* *ликвор*  - спинномозговая жидкость ( жидкость мутная , при пункции вследствие высокого давления вытекает струей)
* кровь
* носоглоточная слизь
* пунктат из элементов сыпи

***Микроскопический метод:***

* микроскопия мазков, приготовленных непосредственно из исследуемого материала (ЦСЖ) и окрашенных по Граму (выявление грамотрицательных бобовидных диплококков внутри лейкоцитов)

***Бактериологический (культуральный)***

* Посев исследуемого материала на питательные среды (кровяной и сывороточный)
* Инкубация при температуре 37ºC с повышенным содержанием углекислого газа в течение 18-24 часов
* Идентификация выделенной культуры по морфо-биологическим свойствам
* Определение чувствительности к антибиотикам

***Серологический***

* Реакции преципитации и иммуноферментного анализа с ликвором
* Реакция пассивной гемагглютинации (РПГА) и ИФА с сывороткой

**Лечение**

* Бензилпенициллин
* Хлорамфеникол
* Цефалоспорины III поколения

**Специфическая профилактика** *–* для активной иммунизации используют вакцины из очищенных капсульных полисахаридов менингококков серогрупп A и C.

**Гонококки**

**Классификация**

Семейство : *Neisseriaceae*

Род : ***Neisseria***

Вид: *N.gonorrhoeae* (патогенный)

**Морфо-биологические свойства:**

**Neisseria gonorrhoeae –** грамотрицательные диплококки бобовидной формы размером 1.25-1.0 x 0.7-0.8 мкм. Неподвижны, спор не образуют , имеют капсулу.

**Neisseria gonorrhoeae - культуральные свойства:**

* Аэробы.
* Требовательны к питательным средам, для их культивирования в питательную среду добавляют нативные белки (сыворотка, кровь, яичный желток).
* ***На плотных питательных средах*** с добавлением сыворотки образуют прозрачные или слегка мутные блестящие колонии, напоминающие капельки росы 1-2 мм в диаметре.
* Не вызывают гемолиза в кровяном агаре. На жидких питательных средах растут диффузно и образуют поверхностную пленку, которая со временем оседает на дно.

**Ферментативная активность** слабая. Расщепляет глюкозу до кислоты. Образует каталазу и цитохромоксидазу. Не обладает протеолитической активностью - не образует аммиак, индол и сероводород.

|  |  |
| --- | --- |
| **Признак** | **N.gonorrhoeae** |
| **Глюкоза** | **+** (до кислоты) |
| **Aммиак** | **-** |
| **Индол** | **-** |
| **Сероводород** | **-** |
| **Оксидаза** | **+** |
| **Kaталаза** | **+** |
| **Нитраты** | **-** |

**Антигенная структура Neisseria gonorrhoeae.**

* Пили
* Поверхностные белки наружной мембраны:

- *Por-протеины* - PorA и PorB

- *Opa-протеины* – протеины мутности, усиливают адгезию к клеткам макроорганизма

**Факторы патогенности гонококков**

* **капсула –** обладает антифагоцитарной активностью.
* **пили -** обеспечивают адгезию.
* **липолиолигосахариды (ЛПС) –** обеспечивают токсичность гонококков.
* **белки наружной мембраны (Por-, Opa-белки) –** обеспечивают адгезию, инвазию, устойчивость к бактерицидным факторам, торможение фагоцитарной реакции.
* **IgA-протеаза –** расщепляет А1-иммуноглобулин. Он обеспечивает адгезию гонококка к эпителиальной клетке.

**Neisseria gonorrhoeae - эпидемиология:**

***Источник инфекции*** -больной человек

***Механизм*** и путь передачи: контактный (половой)

**Вызываемые заболевания:**

* гонорея
* бленнорея («*oftalmia neonatorum»*)
* Генерализованные инфекции и экстрагенитальные осложнения (бактериемия, артрит и др.)

**Иммунитет.** Многочисленные антигенные вариации гонококков являются одной из основных причин неэффективности постинфекционного иммунитета. Поэтому часто встречаются рецидивирующие гонококковые инфекции.

**Микробиологическая диагностика острой и хронической гонореи:**

*Материал для исследования берут стерильным ватным тампоном из:*

* уретры
* влагалища
* шейки матки
* конъюнктивы
* прямой кишки
* зева

*Также возможно исследование осадка мочи*

*Микроскопический (при острой гонорее)*

* Микроскопия мазка , приготовленного из исследуемого материала (взятого тампоном из влагалища и уретры ) и окрашенного по Граму (видны грамотрицательные внутриклеточные диплококки бобовидной формы)
* *Бактериологический (культуральный)*
* Посев исследуемого материала на питательные среды (с добавлением сыворотки или асцитической жидкости)
* Инкубация при температуре 37ºC с повышенным содержанием углекислого газа в течение 18-24 часов
* Выделенную культуру идентифицируют по морфо-биологическим свойствам
* Определение чувствительности к антибиотикам
* *Серологический (при хронической гонорее)*
* *Иммуноферментный метод (ИФА )*
* *Молекулярно-генетический метод*

*Полимеразная цепная реакция (ПЦР)*

**Методы экспресс диагностики**

* *Minitek система*
* *Gonochek II*
* *RİM-N sistemi*
* *Rapid N/H система*
* *Quadferm (Api)*
* *ИФА* - *основан на обнаружении антигена в уретральном и цервикальном секрете при уретрите и цервиците.*
* *Иммунный электрофорез, латексный и коагглютинационный методы - антигены N. meningitidis определяются в спинномозговой жидкости и других жидкостях организма.*
* ***Лечение*** - цефалоспорины
* азитромицин
* Иммунотерапия - гоновакцина. пирогенал
* ***Профилактика*** – для профилактики бленнореи новорожденным закапывают в глаза 1%-ый нитрат серебра , или 30%-ый раствор альбуцида
* ***Средства специфической профилактики при гонорее отсутствуют****!*

**Микробиологическая диагностика заболеваний, вызываемых условно-патогенными бактериями (клебсиелла, протей, синегнойная палочка)**

**Род Klebsiella**

* В патологии человека основная роль принадлежит видам *K.oxytoca* и *K.pneumoniae*
* *K.pneumoniae по биохимическим свойствам подразделяется на 3 подвида*: *K.subsp.pneumoniae, K.subsp.ozaenae, K.subsp.rhinoscleromatis*

**Род Klebsiella - культуральные свойства:**

* Факультативные анаэробы.Хорошо растут на обычных питательных средах при температуре 37°С и рН 7,2-7,4.
* в твердых питательных средах образуют большие куполообразные слизистые колонии, вызывают сильное помутнение в жидких средах.
* Поскольку большинство клебсиелл расщепляют лактозу, они образуют малиново-красные колонии с металлическим блеском на среде Эндо и розовые колонии на среде MacConkey.

**Биохимическая дифференциация бактерий рода *Klebsiella***

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **признаки** | K.oxytoca | K.pneumoniae *spp. ozenae* | K.pneumoniae *spp. pneumoniae* | K.Pneumoniae spp. rhinocleromatis |
| Индолообразование | **+** | **-** | **-** | **-** |
| Реакция с метил-ротом | **+/-** | **+** | **-** | **-** |
| Реакция Фогеса-Проскауэра | **+** | **-** | **+** | **-** |
| Утилизация цитрата | **+** | **+/-** | **+** | **-** |
| Утилизация малоната | **+** | **+/-** | **+** | **-** |
| Расщепление мочевины | **+** | **+/-** | **+** | **-** |
| Лизидекарбоксилаза | **+** | **+/-** | **+** | **-** |
| Расщепление лактозы | **+** | **+/-** | **+** | **-** |

**Антигенная структура.** Имеют cоматический O- и капсульный K-антигены.

**Факторы патогенности бактерий рода Klebsiella**

* капсула;
* пили;
* энтеротоксины,
* эндотоксин (ЛПС),
* ДНК-aза, нейраминидаза, фосфатаза

**Микробиологическая диагностика**

*Материалы для исследования:*

* мокрота
* моча
* испражнения
* кровь
* гной
* ***Бактериологический (культуральный)***
* Посев исследуемого материала на простые и лактозосодержащие дифференциальные питательные среды
* Инкубация при температуре 37ºC на 18-24 часа
* Идентификация по морфо-биологическим свойствам
* Определение чувствительности к антибиотикам
* ***Гистологический***
* При озене и риносклероме

**Лечение.** Лечение проводят с учетом чувствительности возбудителей к антибиотикам. Препаратами выбора являются аминогликозиды, бета-лактамные антибиотики широкого спектра действия и фторхинолоны.

**Род *Proteus***

Представители рода Proteus – грамотрицательные палочки, капсулу и споры не образуют, подвижны. Род Proteus включает 4 вида. В патологии человека наибольшее значение играют два вида: P.vulgaris və P.mirabilis

**Proteus - морфо-биологические свойства:**

* Представители рода Proteus - грамотрицательные, палочковидные, бескапсульные, без спор, подвижные бактерии.
* Род Proteus включает 4 вида. Виды P.vulgaris и P.mirabilis важны в патологии человека.

**Proteus - культуральные свойства:**

* факультативные анаэробы. Растут в обычных питательных средах. Образуют два типа колоний на плотных питательных средах. Типичной формой роста являются Н-колонии с грубыми вдавливаниями-выпячиваниями, «ползающие» и покрывающие всю поверхность питательной среды в виде стенки (феномен «роения»). В неблагоприятных условиях, например, на средах с добавлением желчи, они образуют крупные О-колонии с ровными краями.
* Культуры протея имеют неприятный запах, так как интенсивно расщепляют белки.

**Proteus - биохимические свойства:**

* Биохимически активны. Расщепляют глюкозу с образованием кислоты и газа, не расщепляют лактозу, образуют сероводород, синтезируют фермент уреазу, растворяют желатин
* оксидазоотрицательны, каталазоположительны.

**Proteus -факторы патогенности:**

* Пили - обеспечивают адгезию белков к эпителиальным клеткам.
* Фермент протеаза – расщепляет IgA и IgG, повышает проницаемость сосудов, дезаминирует аминокислоты.
* Фермент уреаза - играет роль в патогенезе инфекций мочевыводящих путей. Ощелачивание мочи приводит к образованию мочевых камней.
* Бактерии с «фактором роения» имеют морфологию «удлиненных» палочек и обладают способностью прикрепляться к ткани почек и эпителию мочевыводящих путей.

Гемолизин - оказывает цитотоксическое действие на эритроциты, лейкоциты, моноциты, эпителий мочевого пузыря

**Роль в патологии человека бактерий рода Proteus**

* Протеи относятся к условно-патогенным микроорганизмам. Вызывают инфекции мочевыводящих путей (мочекаменная болезнь) и гнойную раневую инфекцию, в том числе сепсис.
* Заболевания могут протекать как эндоинфекция, а также быть результатом внутрибольничной инфекции.

***Микробиологическая диагностика***

*Материалы для исследования:*

* мокрота
* моча
* испражнения
* кровь
* гной

***Методы исследования:***

* ***Бактериологический (культуральный)***
* Посев на простые и лактозосодержащие дифференциальные питательные среды
* Инкубация при температуре 37ºC на 18-24 часа
* Идентификация по морфо-биологическим свойствам
* Определение чувствительности к антибиотикам

**Лечение**

* Лечение проводят с учетом чувствительности возбудителей к антибиотикам.
* Препаратами выбора являются аминогликозиды, бета-лактамные антибиотики широкого спектра действия и фторхинолоны.
* Хороший эффект дает применение фторхинолонов и нитроксолина при инфекциях мочевыводящих путей, а также колипротеиновых бактериофагов при кишечных инфекциях.

**Неферментирующие грамотрицательные аэробные палочки и коккобациллы**

Неферментирующие грамотрицательные аэробные палочки и коккобациллы образуют гетерогенную группу бактерий, не образующих спор. Эти бактерии не ферментируют углеводы и не используют их в качестве источника энергии. Большинство из них не нуждаются в питательной среде, живут во внешней среде (почве, воде, растениях) и обнаруживаются в организме человека. Вызывают оппортунистические инфекции у людей и животных.

Среди этих бактерий наиболее патогенными являются псевдомонады (род Pseudomonas). Другие - *Burkholderia, Alcaligenes, Eikenella, Flavobacterium, Kingella, Moraxerlla* вызывают заболевание в сравнительно редких случаях.

*Род Pseudomonas* (таксономия)

* Сравнительно недавно некоторые бактерии рода Pseudomonas были отнесены к роду Burkholderia
* Представитель рода Pseudomonas - Pseudomonas aeruginosa (синегнойная палочка)–возбудитель многих гнойно-воспалительных заболеваний
* Представители рода Burkholderia: Burkholderia (Pseudomonas) mallei– возбудитель сапа и Burkholderia (Pseudomonas) pseudomallei –возбудитель мелиоидоза.

**Pseudomonas aeruginosa (культуральные свойства)**

* Облигатный аэроб, растет в простых питательных средах. Оптимальная температура 37ºC, но P.aeruginosa отличается от других псевдомонад тем, что может расти при 42ºC.
* P.aeruginosa на твердых питательных средах образует удлиненные, гладкие, полупрозрачные, крупные, плоские, иногда слизистая колонии.
* При культивировании на плотных питательных средах P. aeruuginosa синтезирует триметиламин, который придает бактериальной культуре сиреневый или карамельный запах. Дает помутнение в жидких питательных средах и корку сероватого цвета на поверхности.

**Pseudomonas aeruginosa-рост на питательных средах**:

На кровяном агаре: ß-гемолиз

На средах Эндо и Мак-Конки: лактозонегативные колонии (не ферментируют лактозу)

На мясопептонном агаре: мутные колонии с запахом жасмина

**P.aeruginosa-пигменты:**

* **Piosianin** - голубоватый
* **Pioverdin** - зеленоватый
* **Piorubin** - красный
* **Piomelanin** - черный

Характерным культуральным признаком P. aeruginosa является образование **голубоватого пигмента (пиоцианина).**

**P.aeruginosa - биохимические свойства:**

* *P.aeruginosa* не ферментирует углеводы, но некоторые штаммы окисляют глюкозу. Оксидаза положительна. Восстанавливает нитраты до нитритов и свободного азота.
* P.aeruginosa синтезирует бактериоцины - пиоцины. Пиоцин не воздействует на штаммы-продуценты пиоцина, но влияет на другие штаммы. Вирулентные штаммы отличаются активной продукцией пиоцинов или высокой чувствительностью к ним.

**P.aeruginosa антигенная структура:**

* P.aeruginosa обладает О- и Н-антигенами. P.aeruginosa подразделяют на иммунотипы (серотипы) по термостабильному О-антигену, представляющему собой липополисахарид клеточной стенки. Поскольку термолабильный Н-антиген обладает защитным свойством, его используют при приготовлении вакцинных препаратов.

***Pseudomonas aeruginosa* -факторы патогенности**

* Пили **(фимбрии)** – обеспечивает адгезию.
* Экстрацеллюлярная слизь– участвует в адгезии, имеет свойства антигенности и токсичности.

**Токсины**

* ЛПС **(эндотоксин)** – способствует развитию септического синдрома.
* **Экзотоксин A** (останавливает синтез белка за счет ингибирования фактора элонгации EF-2, который обеспечивает синтез полипептидной цепи в рибосомах клеток)
* **Экзоэнзим S (экзотоксин S)** – ADF-трансферазная активность.
* **Цитотоксин (leykosidin)** – токсичен к полиморфноядерным лейкоцитам.
* **Энтеротоксический фактор**– термолабильный протеин.

**Ферменты агрессии:**

* Гемолизин – разрушая фосфолипиды на поверхности альвеол легких, вызывает некротические повреждения.
* Нейраминидаза – нарушает метаболизм веществ, содержащих нейраминовую кислоту.
* **щелочная протеаза, эластаза, и коллагеназа** – разрушая эластин, коллаген, иммуноглобулины, комплемент, лизоцим, белки роговицы, вызывает деструкцию и некроз тканей.

Эпидемиология

* ***Источник инфекции:***больные и бактерионосители
* ***Пути и механизмы заражения:*** контактный и фоздушно-пылевой

**Роль в патологии человека**

* Нозокомиальные инфекции
* Ожоговая болезнь
* Гнойные инфекции хирургических ран
* кератит
* Отит
* Муковисцидоз
* Инфекции мочевыводящих путей
* Септикопиемия (*«ecthyma gangrenosa»)*

**Иммунитет.**

* Формируется антитоксический и антибактериальный иммунитет. Антитоксический иммунитет связан с антителами, которые нейтрализуют бактериальные токсины, особенно экзотоксин

**Микробиологическая диагностика**

*Материалы для исследования:*

* Кровь (при сепсисе)
* Гной и раневое отделяемое
* Моча
* Мокрота

**Методы исследования:**

* ***Бактериологический (культуральный)***
* Посев исследуемого материала на простые и лактозосодержащие дифференциальные питательные среды
* Инкубация при температуре 37ºC на 18-24 часа
* Идентификация по морфо-биологическим свойствам
* Определение чувствительности к антибиотикам

**Лечение.**

* В настоящее время клинические изоляты P.aeruginosa чувствительны к некоторым бета-лактамным антибиотикам (пиперациллин, имипенем), в том числе к цефалоспоринам (цефтазидим, цефоперазон) и аминогликозидам (гентамицин, тобрамицин, амикацин, нетилмицин), а также к хинолонам (офлоксацин, ципрофлоксацин, левофлоксацин).
* При лечении локальных инфекций применяют также сине-гнойные бактериофаги или поливалентные пиобактериофаги.

Ацинетобактерии широко распространены в окружающей среде – почве и воде. Они входят в состав нормальной микрофлоры человека, встречаются как комменсалы в коже здоровых людей, в слизистой оболочке носоглотки. Виды *Acinetobacter baumannii* и *A. johnsonii* вызывают внутрибольничные (нозокомиальные) инфекции. Среди возбудителей внутрибольничных инфекций ацинетобактерии, занимающие второе место после псевдомонад, вызывают сепсис, перитонит, эндокардит, раневые и ожоговые инфекции, особенно у детей и лиц среднего возраста. Обнаруживается на слизистых оболочках мочеполовых и дыхательных путей, на поражениях кожной поверхности. Инфекции в основном наблюдаются у лиц с ослабленным иммунитетом.

**Acinetobacter - морфо-биологические свойства:**

Acinetobacter - это грамотрицательные кокки или коккобациллы. В мазках из патологического материала, а также из колоний, развивающихся на плотных питательных средах, располагаются в виде диплококков и напоминают нейссерии. Иногда они могут быть толстыми, короткими, полиморфными, длиной 1,5-2,5 мкм, в форме палочки. В мазках встречаются в смешанном состоянии, иногда в виде коротких цепочек. Малоподвижны, спор не образуют, есть пили, могут образовывать капсулу.

**Acinetobacter - культуральные свойства:**

* облигатные аэробы. Растут на простых питательных средах с нейтральным рН, при температуре 30-35°С. Образуют мелкие блестящие колонии на плотных питательных средах, иногда с зоной альфа-гемолиза на кровяном агаре.

**Acinetobacter - биохимические свойства:**

* Биохимическая активность слабая. Не расщепляют полисахариды, некоторые виды ферментируют моносахариды с образованием кислоты, что позволяет дифференцировать их. Не образуют индол и сероводород.

**Группы риска:**

* Инфекции Acinetobacter обычно возникают у людей в медицинских учреждениях. К группе наибольшего риска относятся пациенты в больницах, особенно:
* подключенные к дыхательному аппарату (вентиляторах).
* с катетером
* имеющие открытые раны после операции
* Находящиеся в отделениях интенсивной терапии
* длительно пребывающие в больнице
* люди с ослабленным иммунитетом, с хроническими заболеваниями легких или сахарным диабетом

**Acinetobacter- микробиологическая диагностика**

* Для исследования используются такие материалы, как кровь, гной и содержимое раны.
* Идентификацию культуры проводят на основании ее биохимических свойств. Acinetobacter, полученный при менингите и сепсисе, следует дифференцировать от N. meningitidis, а Аcinetobacter, полученный из женских половых органов, - от N. gonorreae. В отличие от Neisseria, Acinetobacter оксидазоотрицательны.

**Acinetobacter- лечение**

* Поскольку изоляты Acinetobacter достаточно устойчивы к антибиотикам, лечение проводят с учетом чувствительности к антибиотикам. Acinetobacter обычно чувствительны к гентамицину, амикацину, тобрамицину, цефалоспоринам III поколения.
* Устойчивый к карбапенемам Acinetobacter обычно обладает множественной лекарственной устойчивостью.