

Занятие 1.

**Основные принципы микробиологической диагностики,
цели и задачи. Микробиологическая диагностика
заболеваний, вызванных грам-положительными кокками
(стафилококки, стрептококки)**

Обсуждаемые вопросы:

- 1. Основные задачи частной медицинской микробиологии.
- 2. Значение выбора патологического материала для клинической диагностики. Сбор патологического материала, хранение, отправка в лабораторию. Обеззараживание оставшегося после исследования патологического материала.
- 3. Грамположительные кокки, являющиеся возбудителями гнойно-воспалительных процессов
- 4. Стафилококки, их классификация, морфобиологические особенности, факторы патогенности и резистентные к антибиотикам формы (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), methicillin-resistant coagulase-negative *Staphylococcus* (MRCNS)).
- 5. Микробиологическая диагностика заболеваний, вызванных стафилококками.
- 6. Специфическое лечение и профилактика стафилококковых инфекций.
- 7. Стрептококки, их классификация, морфобиологические особенности, антигенная структура, факторы патогенности и вызываемые ими заболевания. Роль стрептококков в развитии ревматизма и гломерулонефрита.
- 8. Микробиологическая диагностика заболеваний, вызванных стрептококками.
- 9. Специфическое лечение и профилактика стрептококковых инфекций.
- 10. Пневмококки (*Streptococcus pneumoniae*), морфобиологические особенности, антигенная структура, вызываемые ими заболевания и признаки, отличающие пневмококки от других стрептококков.
- 11. Микробиологическая диагностика пневмококковых инфекций.
- 12. Специфическое лечение и профилактика пневмококковых инфекций.
- 13. Другие важные с медицинской точки зрения стрептококки (энтерококки, антибиотикорезистентные формы (ванкомицинрезистентный энтерококк (VRE)), *S.agalactiae*, *S.mutans*, *S.mitis* и др.)

Цель занятия:

- Введение в частную микробиологию, дать информацию студентам о клинически значимых бактериях: патогенных и условно-патогенных грамположительных кокках, в особенности, устойчивых к антибиотикам формам (*Staphylococcus* (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), methicillin-resistant coagulase-negative *Staphylococcus* (MRCNS)), *Streptococcus*, vancomycin-resistant *Enterococcus* (VRE)), их морфобиологических особенностях, факторах патогенности, микробиологической диагностике, специфическом лечении и профилактике вызываемых ими заболеваний.

➤ **Частная медицинская
микробиология:**

Медицинская микробиология – предмет, изучающий особенности микроорганизмов – возбудителей инфекционных заболеваний человека и патологические процессы, происходящие в организме.

Задачи медицинской микробиологии: лабораторная диагностика ,
разработка методов лечения и специфической профилактики
заболеваний , вызываемых микроорганизмами.

➤ *Частная микробиология* —занимается изучением особенностей отдельных микроорганизмов. На основании изучаемых микроорганизмов она имеет следующие направления:

- **бактериология** (наука о бактериях)
- **вирусология** (наука о вирусах)
- **микология** (наука о грибах)
- **протозоология** (наука о простейших)

➤ *Клиническая микробиология :*

- *Клиническая микробиология* — раздел медицинской микробиологии, изучающий микробиологию инфекционных заболеваний органов и систем макроорганизма и принципы микробиологической диагностики этих заболеваний.

➤ *Санитарная микробиология:*

- Раздел медицинской микробиологии, изучающий микроорганизмы, содержащиеся в окружающей среде и способные оказывать неблагоприятное воздействие на организм человека .
- *Цель санитарной микробиологии* – обнаружение микроорганизмов-возбудителей заболеваний в объектах окружающей среды , разработка мероприятий по контролю контаминации этих объектов с целью предотвращения распространения инфекционных заболеваний.

Грамположительные кокки как возбудители гнойно-воспалительных заболеваний:

- *Стафилококки*
- *Стрептококки*
- *Пневмококки*
- *Энтерококки*
- *Пептококки*
- *Пептострептококки*

Семейство Staphylococcaceae (современная таксономия)

- **Домен (Domain):** Бактерии
- **Царство (Kingdom):** Bacillota
- **Класс (Class):** Bacilli
- **Порядок (Order):** Bacillales
- **Семейство (Family):** Staphylococcaceae
- **Род (Genus):** *Staphylococcus*
 - **Род (Genus):**
 - *Abyssicoccus*
 - *Aliicoccus*
 - *Auricoccus*
 - *Corticicoccus*
 - *Gemella*
 - *Jeotgalicoccus*
 - *Macrococcus*
 - *Nosocomiicoccus*
 - *Salinicoccus*
 - **Staphylococcus**
 - **Вид (Species):** Включает около 40 видов (*S.hominis*, *S.albus*, *S.haemolyticus*, *S.simulans*, *S.sciuri* и др.). Медицински значимые- ***S.aureus***, ***S.epidermidis***, ***S.saprophyticus***.

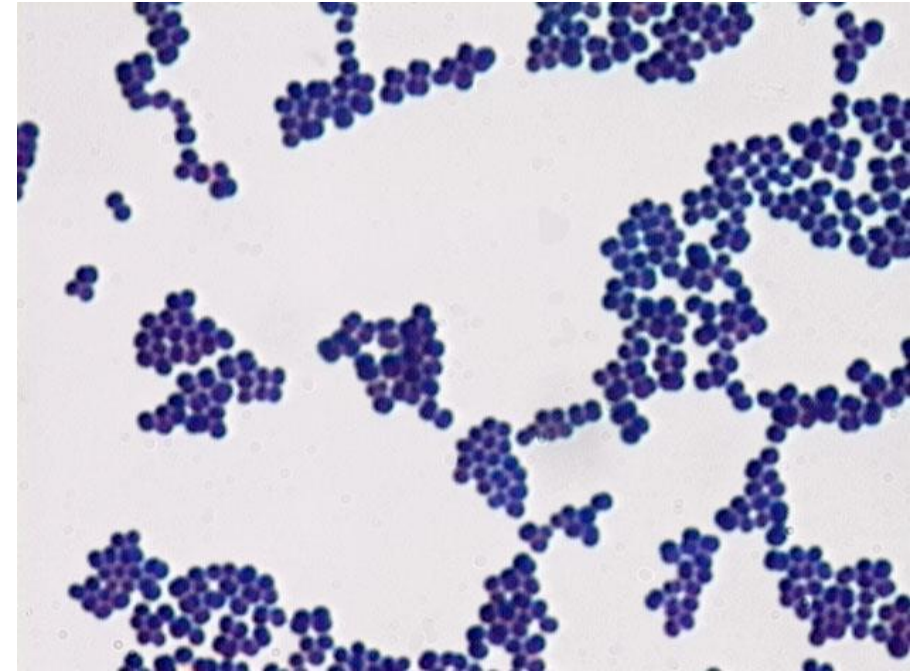
Стафилококки :

Классификация :

Семейство : *Micrococcaceae*

Род : *Staphylococcus*

Вид : *S.aureus*, *S.epidermidis*,
S.saprophyticus

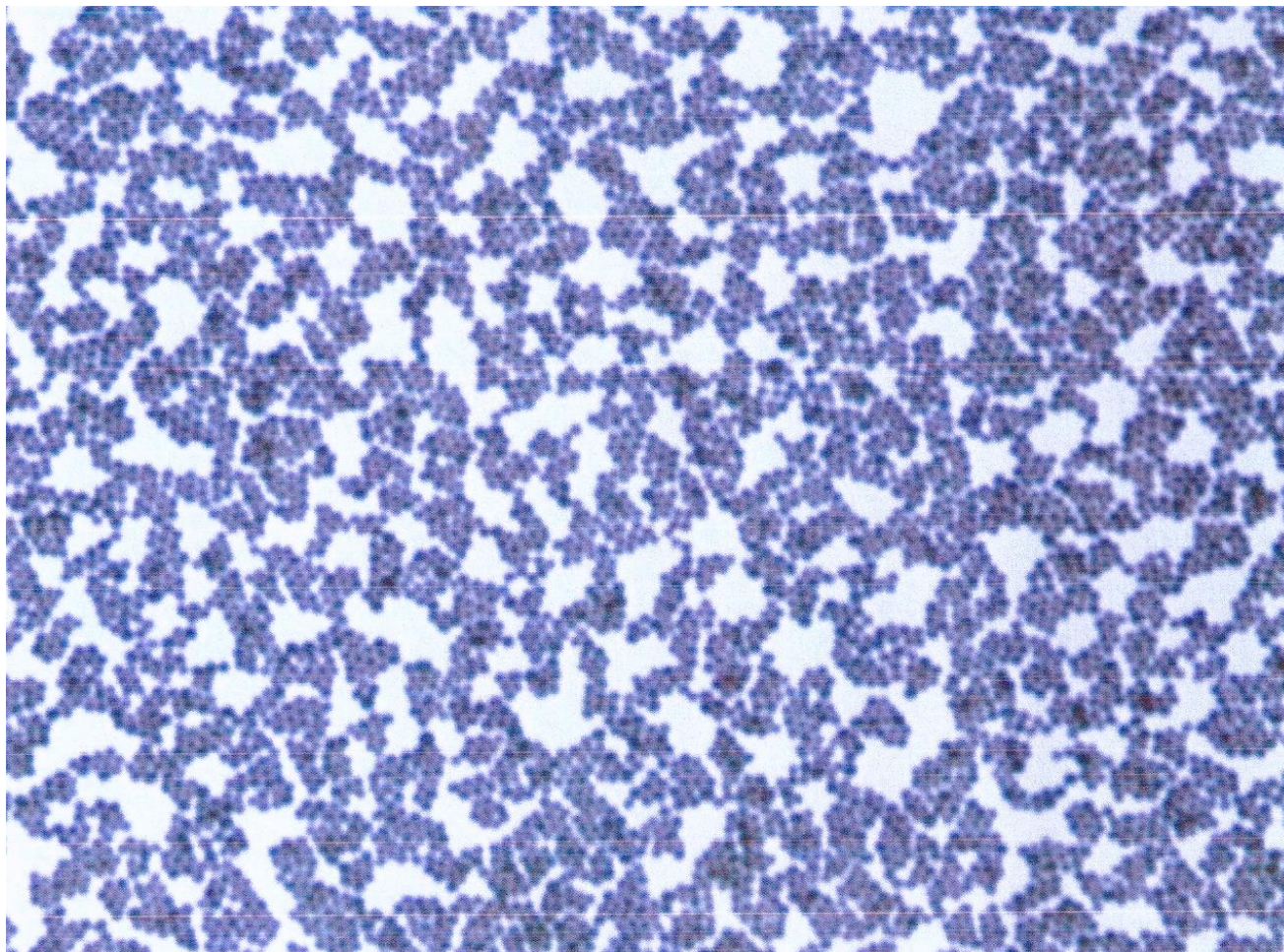


Морфобиологические особенности:

Род *Staphylococcus* — грамположительные, неподвижные бактерии сферической формы диаметром 1 мкм .Спор не образуют , могут образовывать микрокапсулу. Свойство образовывать скопления , напоминающие «**гроздья винограда**» в результате деления во взаимно перпендикулярных плоскостях .

Staphylococcus aureus

(мазок из чистой культуры , окраска по Граму, x100)



Морфобиологические свойства :

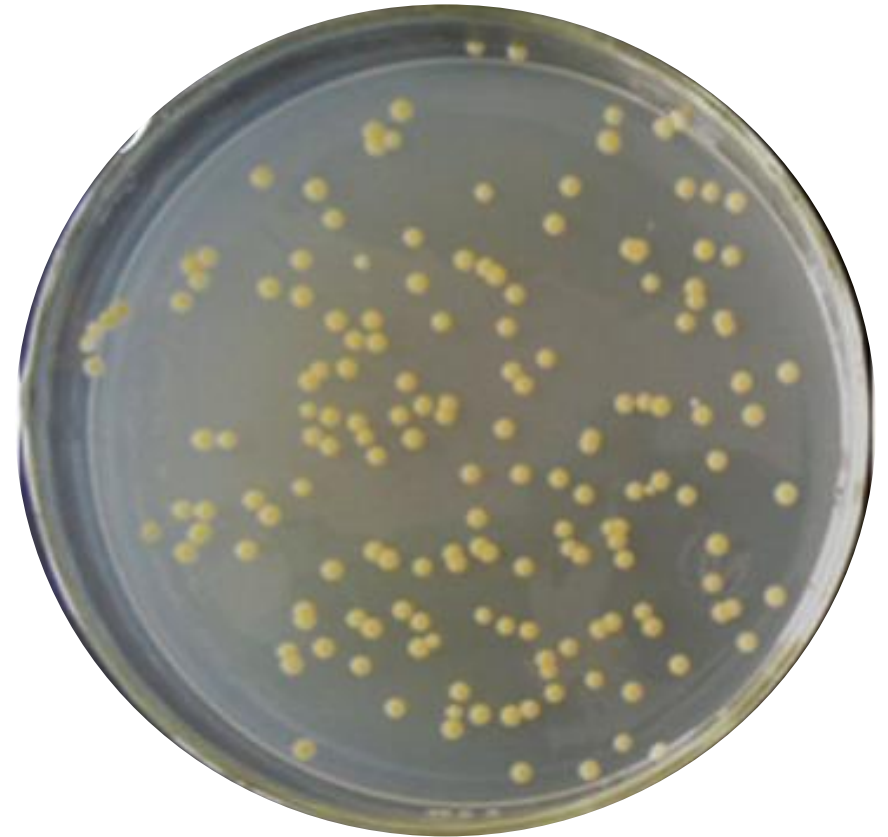
На плотных питательных средах - образуют круглые , гладкие, выпуклые , блестящие колонии ; *Staphylococcus aureus* вырабатывает золотистый пигмент, окрашивающий колонии в желтый цвет.

На жидких питательных средах - дают диффузное помутнение , а затем рыхлый осадок .

Staphylococcus aureus

Культуральные свойства

Факультативный анаэроб. Не требователен к питательной среде, рост в обычных питательных средах. Оптимальная температура 35-40°C, pH 7,0-7,5. На твердой питательной среде - гладкие, выпуклые светлые колонии; Поскольку *Staphylococcus aureus* выделяет золотистый пигмент, в некоторых случаях его колонии окрашиваются в желтый цвет.



Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus

Культуральные свойства

В жидкой питательной среде - образует диффузную мутность. Лучший рост наблюдается в среде с добавлением сахаров. Желточно-солевой или молочно-солевой агары являются для селективными питательными средами.



Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus

(лецитиназный тест на желточно-солевом агаре)

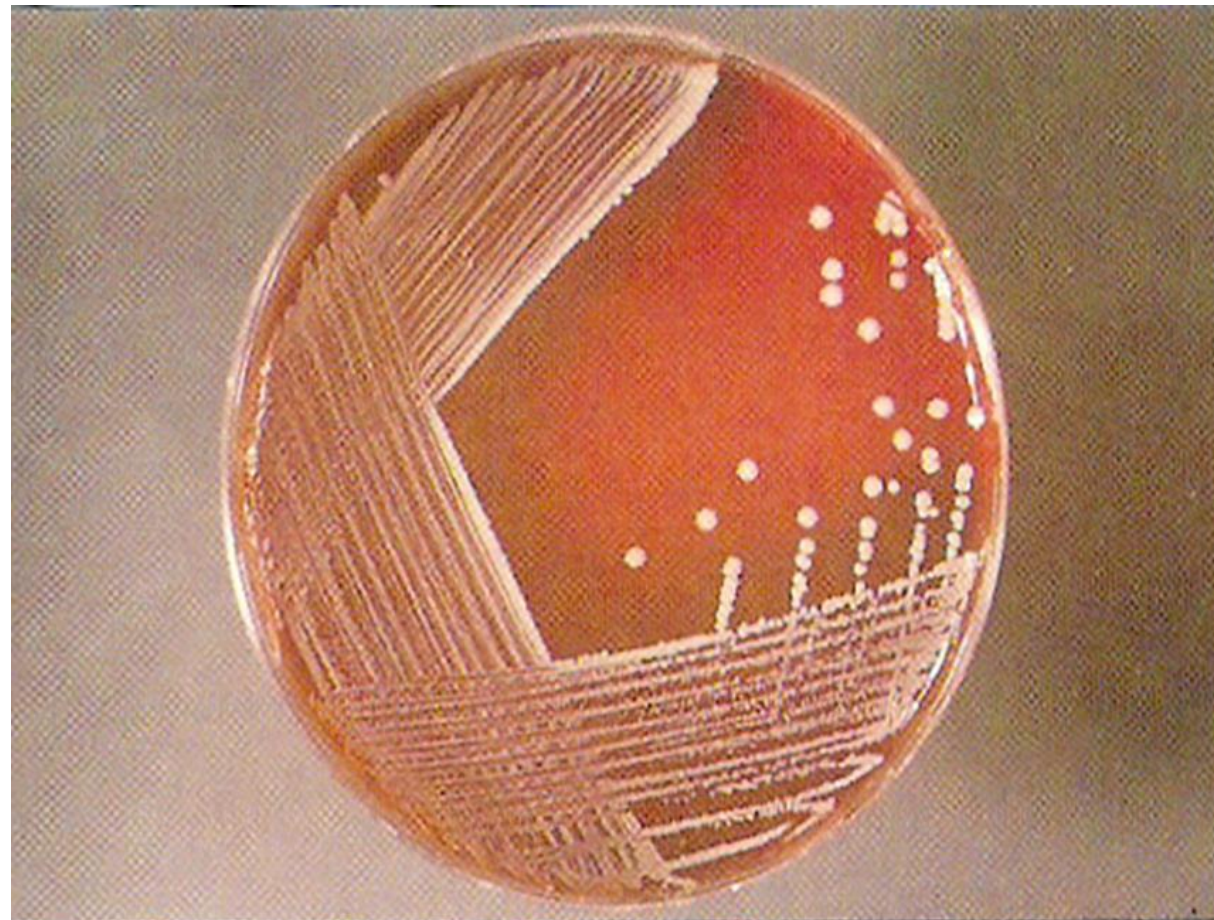
Лецитиназная проба - за счет действия фермента лецитиназы вокруг колоний *S.aureus* образуется короновидная размытая кайма.



Культуральные свойства:
(на кровяном агаре вызывают гемолиз)



Staphylococcus aureus
(гемолитические колонии, зоны бета-гемолиза)



Staphylococcus epidermidis
(негемолитические колонии)

Staphylococcus cinsi

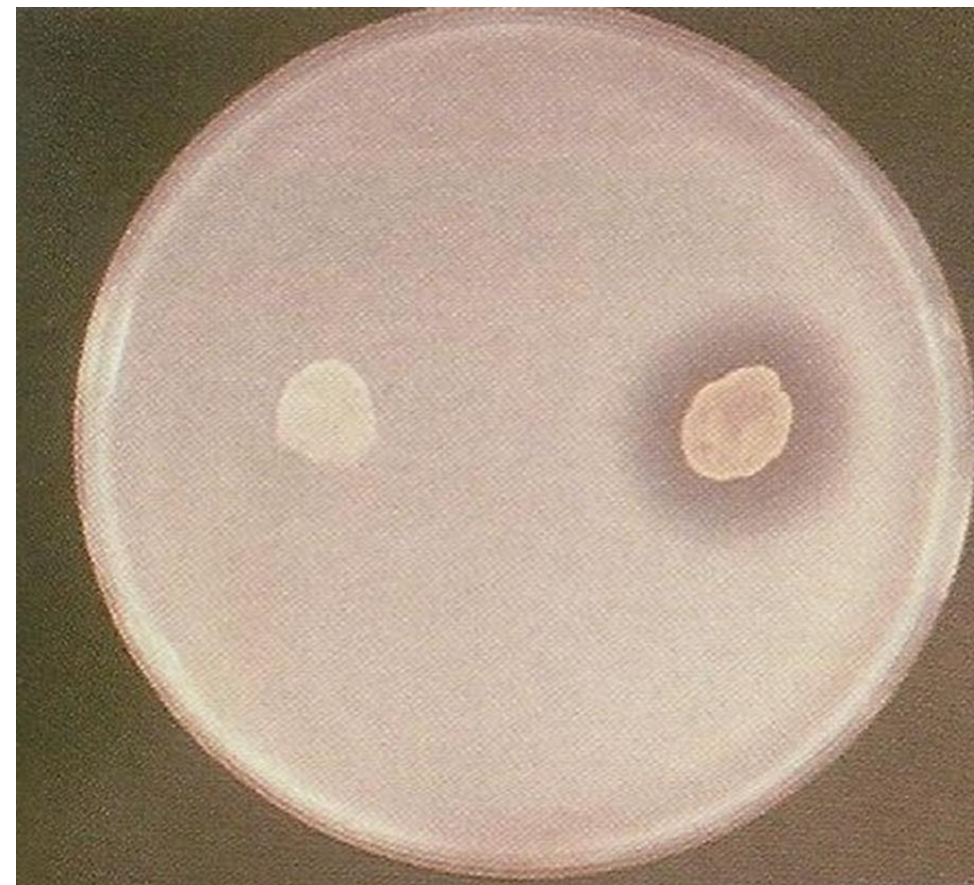
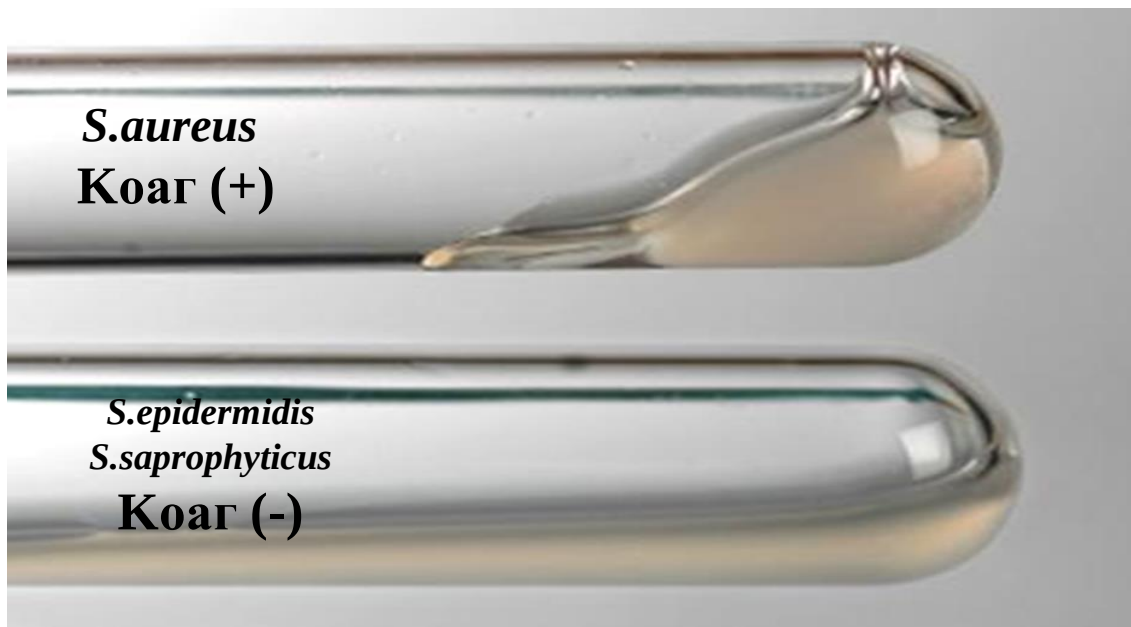
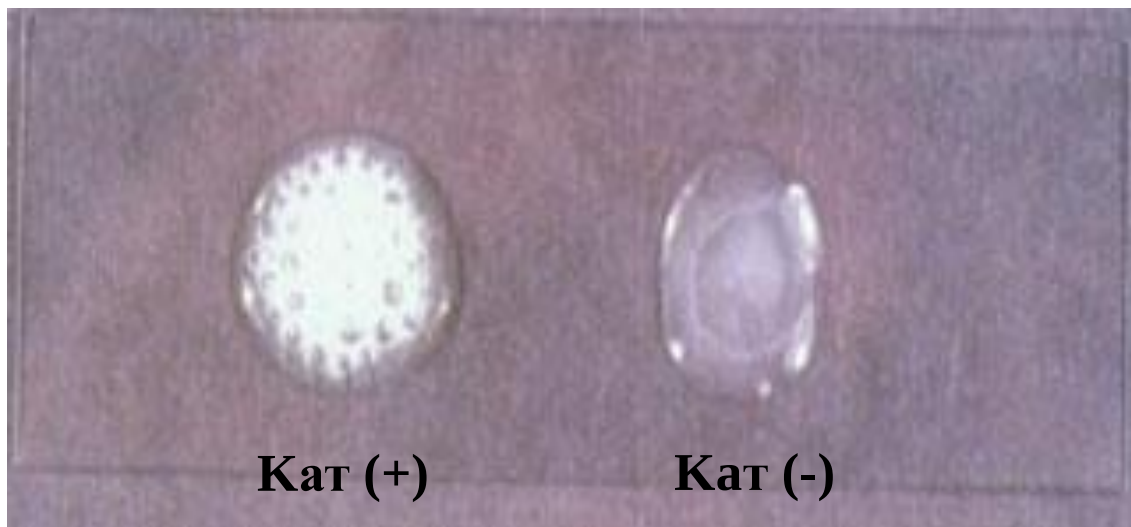
Фементативная активность

- Стафилококки биохимически активны. Вырабатывают каталазу, расщепляют многие углеводы лишь постепенно, образуя кислоту. Большинство штаммов продуцируют ацетон в среде с глюкозой (положительная реакция Фогеса-Проскауэра), восстанавливают нитраты до нитритов.
- Разные виды различаются по своим протеолитическим свойствам, не продуцируют индол.
- В анаэробных условиях расщепляют глюкозу до молочной кислоты, что отличает стафилококки от микрококков.

Биохимические свойства стафилококков
(внутривидовые дифференциальные признаки)

<i>Признак</i>	<i>S.aureus</i>	<i>S.epidermidis</i>	<i>S.saprophyticus</i>
β-гемолитическая активность	+	-	-
Восстановление нитратов	+	+	-
Ферментация маннита в анаэробных условиях	+	-	-
Ферментация маннита в аэробных условиях	+	-	+
Коагулаза	+	-	-
Гиалуронидаза	+	±	-
Фибринолизин	±	±	-
Щелочная фосфатаза	+	+	-
ДНКаза	+	-	-

Род Staphylococcus (биохимические свойства)



ДНКаза (-)
S.epidermidis

ДНКаза (+)
S.aureus

Род Staphylococcus

Антигенные свойства

микрокапсула -

пептидогликан -

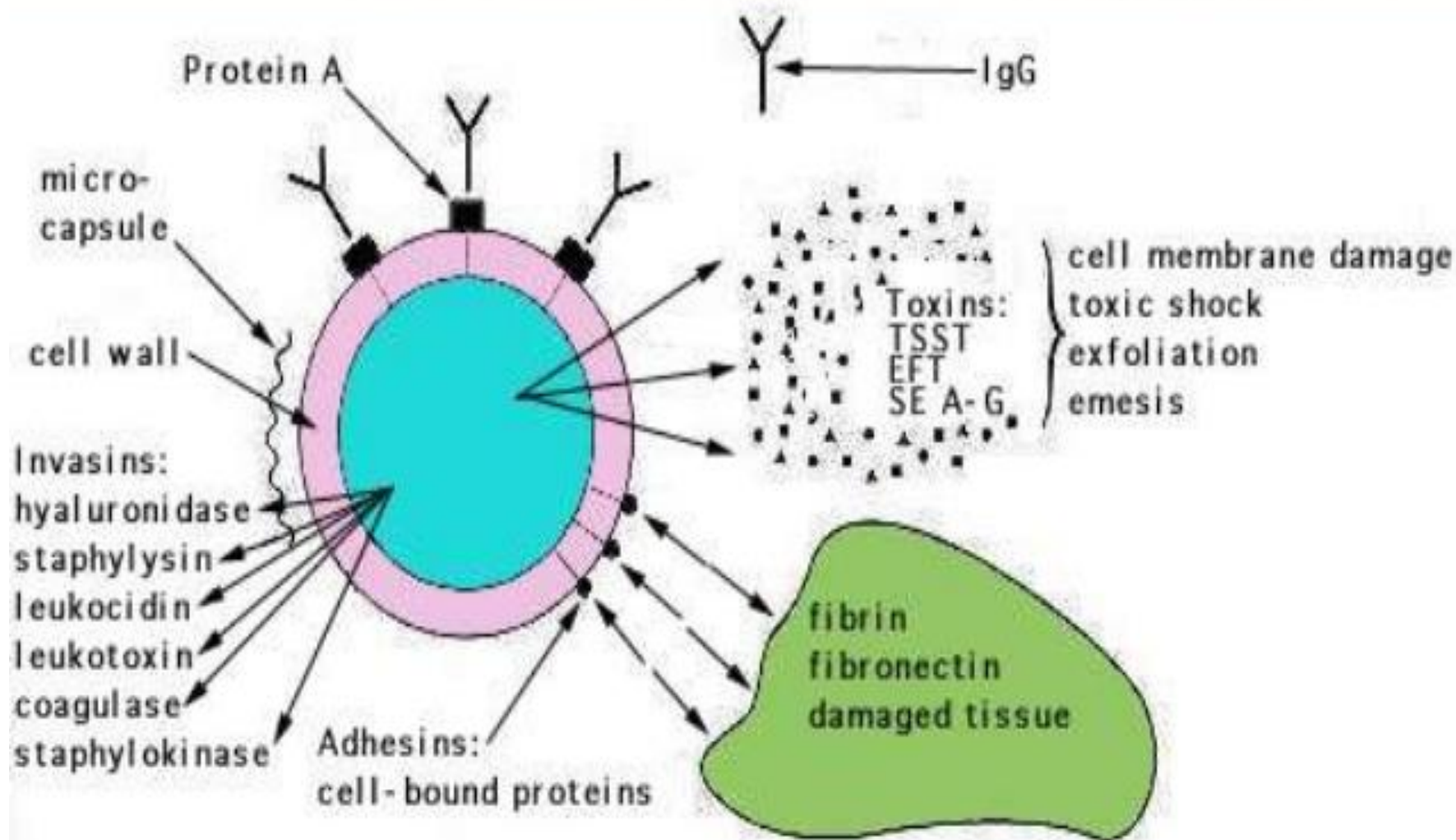
А-пептид- Встречается только у *S.aureus*.

Связываясь с Fc-рецепторами иммуноглобулинов, защищает бактерии от фагоцитоза и действия комплемента. Белок А стафилококков взаимодействует со специфическими IgG, связанными с различными бактериями, и вызывает их агглютинацию, что называется реакцией *коагглютинации*.

тейхоевая кислота - обладает видоспецифичностью:

- *S.aureus* - *рибиттейхоевая кислота*
- *S.epidermidis* - *глицеринтейхоевая кислота*
- *S.saprophyticus* – *рибит-глицеринтейхоевая к.*

Факторы патогенности *Staphylococcus aureus*



Staphylococcus aureus – факторы патогенности:

➤ Клеточные компоненты:

- **микрокапсула** (защищает от фагоцитоза, обеспечивает адгезивность и распространение в ткани)
- **Компоненты клеточной стенки** (хемоаттрактант нейтрофилов, активируя систему комплемента индуцирует воспалительные реакции)
- **Протеин А** (неспецифически связывается с Fc-фрагментом IgG, активируя комплемент классическим и альтернативным путями)

➤ Факторы патогенности:

- **коагулаза** (взаимодействует с протромбином с образованием тромбиноподобного вещества и вызывает свертывание сыворотки, что защищает стафилококки от действия факторов защиты)
- **фибринолизин** (растворяет тромб, разрушая фибрин)
- **гиалуронидаза** (расщепляет гиалуроновую кислоту, содержащуюся в межклеточной среде соединительной ткани)
- **каталаза** (защищает бактерии от кислородозависимого микробицидного киллинга фагоцитами)
- **Бета-лактамаза** (защищают их от действия соответствующих антибиотиков, расщепляя молекулы антибиотиков)
- **стафилокиназа** (расщепляя фибрин, способствует распространению стафилококков в тканях)
- **лецитиназа**

Staphylococcus aureus – факторы патогенности :

➤Токсины:

- **гемолизин** (альфа-,бета-,дельта-,гамма-) – (альфа-гемолизин – не влияет на эритроциты человека, бета-гемолизин – воздействует на многие клетки, в том числе и на эритроциты, так как разрушает сфингомиелин, дельта-гемолизин – действуя на биологические мембраны вызывает диарею, гамма-гемолизин - слабо действует на эритроциты человека, обладает свойством опосредованно лизировать лейкоциты).
- **лейкоцидин** (убивает лейкоциты человека и животных, оказывая цитотоксическое действие, с этим токсином связано образование гноя стафилококками. Вызывает диарею, активируя синтез циклического АМФ) **эксфолиатин** (разрушает мукополисахаридный матрикс эпидермиса и вызывает генерализованное отслаивание кожи - синдром "обожженной кожи")
- **токсин синдрома токсического шока** (TSST-1) – (являясь типичным суперантигеном, соединяется с антигенами МНС II и вызывает поликлональную стимуляцию Т-лимфоцитов и возникновение синдрома токсического шока)
- **энтеротоксины** (вызывают пищевое отравление)

Генетические основы резистентности к антибиотикам

- устойчивость к метициллину некоторых штаммов *S.aureus* связана с мутациями в них генов, кодирующих синтез пенициллин-связывающих белков, результатом чего является их неспособность связаться с бета-лактамными антибиотиками. По этой причине устойчивые к метициллину штаммы *S. aureus* (MRSA) устойчивы ко всем бета-лактамным антибиотикам.

Резистентность к антибиотикам у стафилококков

- Пеницилиназа влияет только на бета-лактамы, такие как пенициллин и ампициллин, и может быть обнаружена почти у всех штаммов *S. aureus*.
- Устойчивость к метициллину/оксациллину относится к структурным изменениям ПСБ и определяет их устойчивость ко всем бета-лактамным антибиотикам.

Резистентность к антибиотикам у стафилококков

- Эта устойчивость выявляется в лабораториях с помощью «агарового скрининга» в среде, содержащей 6 мкг/мл оксациллина и 4% NaCl.
- Резистентность связана с геном Мес А. В результате ПСБ2 модифицируется, превращаясь в ПСБ2а, который имеет более низкое сродство к бета-лактамам.

Резистентность к антибиотикам у стафилококков

- При метициллинрезистентных стафилококковых инфекциях (как правило, тяжелых инфекциях) в основном применяют гликопептидные антибиотики (ванкомицин, тейкопланин).
- При остальных инфекциях если патоген чувствителен к хинолону, котримоксазолу, гентамицину и т. д., предпочтительным является их применение.

Резистентность к антибиотикам у стафилококков

- В последние годы также сообщалось о штаммах *S. aureus*, устойчивых к гликопептидам.
- *S. aureus* обычно можно обнаружить на коже и в носу.
- Назальное носительство *S. aureus* может вызывать рецидивирующие кожные инфекции, а хирургическое вмешательство представляет риск инфицирования.

Источник инфекции и пути заражения:

- Источником инфекции являются **больные** латентной стафилококковой инфекцией и **бактерионосители**. Большую эпидемиологическую опасность представляют медицинские работники, инфицированные госпитальными штаммами стафилококков (бактерионосителями).
- Стафилококки могут передаваться **контактно-бытовым**, в том числе нестерильным медицинским инструментом, через руки медицинских работников, алиментарным путем - с молочными продуктами, сладостями, воздушно-капельным и воздушно-пылевым (аэрогенным) путем, парентеральным путем.

Инфекции , вызванные стафилококками:



Болезни кожи

пиодермии
фурункул
карбункул
фолликулит
сикозы
ячмень(инфекции век)
импетиго
пемфигус
панариций
гидраденит
раневые инфекции
Болезнь Риттера



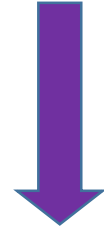
Гнойно-воспалительные процессы

абсцессы	артрит
флебит	пневмония
	ангина
остеомиелит	сепсис
менингит	плеврит
эндокардит	пиелит
стоматит	
энтерит	цистит
перитонит	
конъюнктивит	
уретрит	мастит
отит	эндокардит



Пищевые отравления

вызывают
стафилококки,
выделяющие
энтеротоксины



Синдром токсического шока

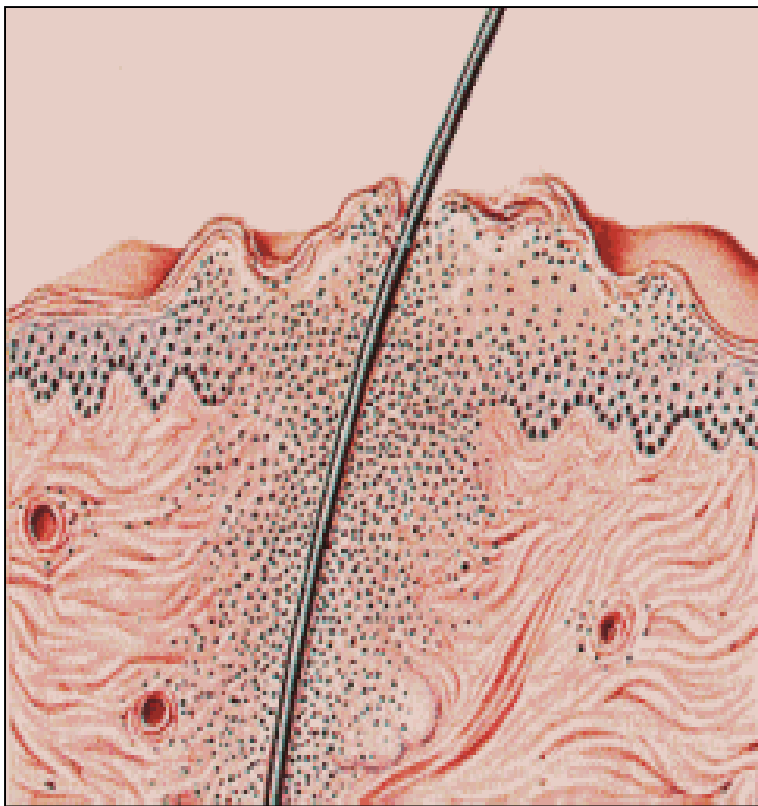
вызывается
штаммами
S.aureus,
синтезирующими
TSST-1-токсин

Патогенетические механизмы *S.aureus* инфекций:

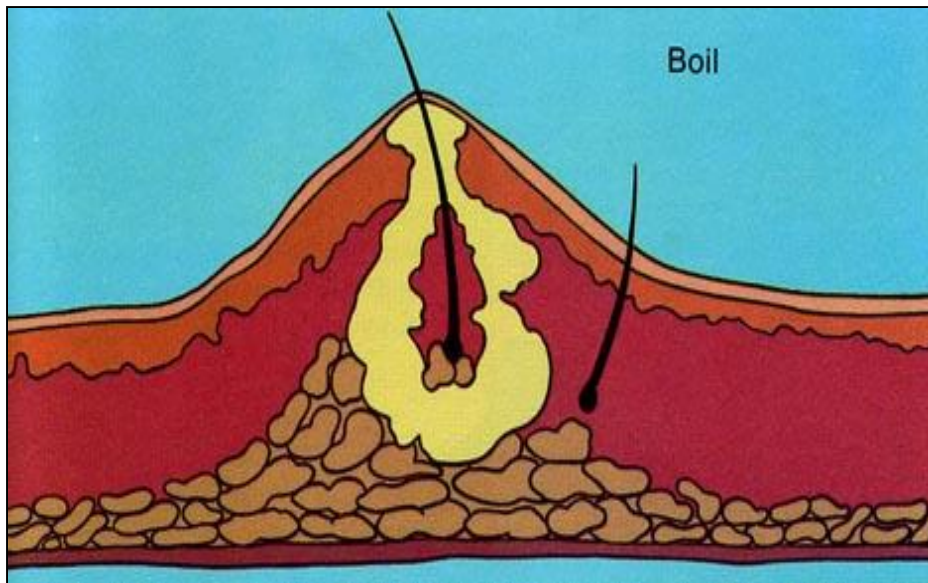
- Кокки попадают в поврежденную кожу, слизистую оболочку или ткань
- Колонизируют, прикрепляясь к клеткам или внеклеточному матриксу.
- Ускользают от защитных механизмов хозяина
- Вызывают повреждение тканей

Стафмлококковые инфекции: кожа и мягкие ткани

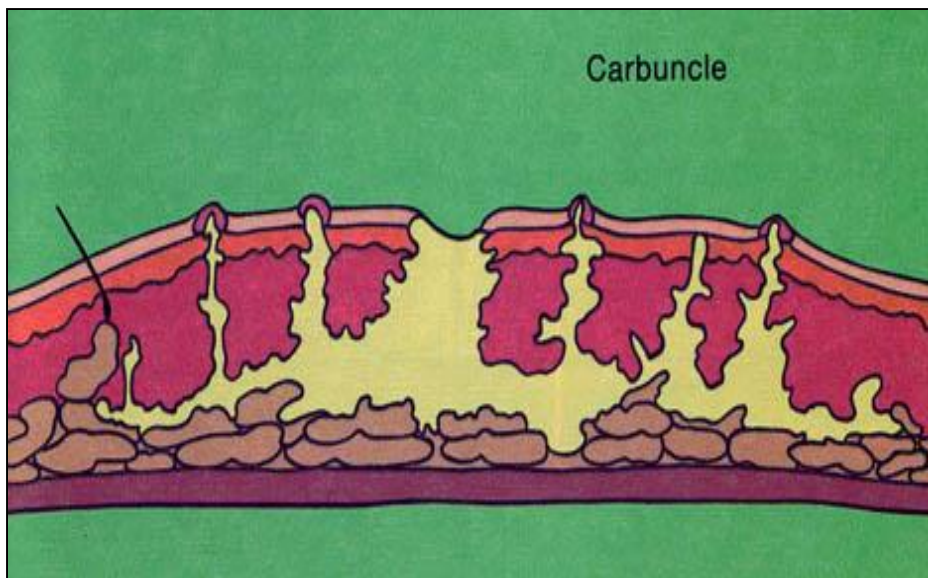
- Фолликулит
- Фурункул
- Карбункул
- «ячмень» (hordoleum)
- Абсцесс
- Раневые инфекции
- Импетиго (буллез)
- паронихий
- Целлюлит (реже)
- Sycosis barbae
- Гидроаденит



Фолликулит



Фурункул



Карбункул



Ячмень



Абсцесс



Импетиго



Паронихия



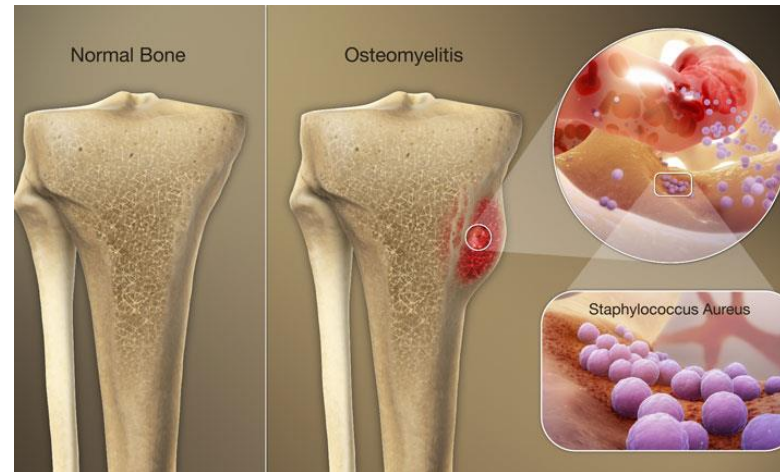
Раневая инфекция



Целлюлит

Стафилококковые инфекции : Опорно-двигательная система:

- Остеомиелит, артрит, бурсит, пиомиозит

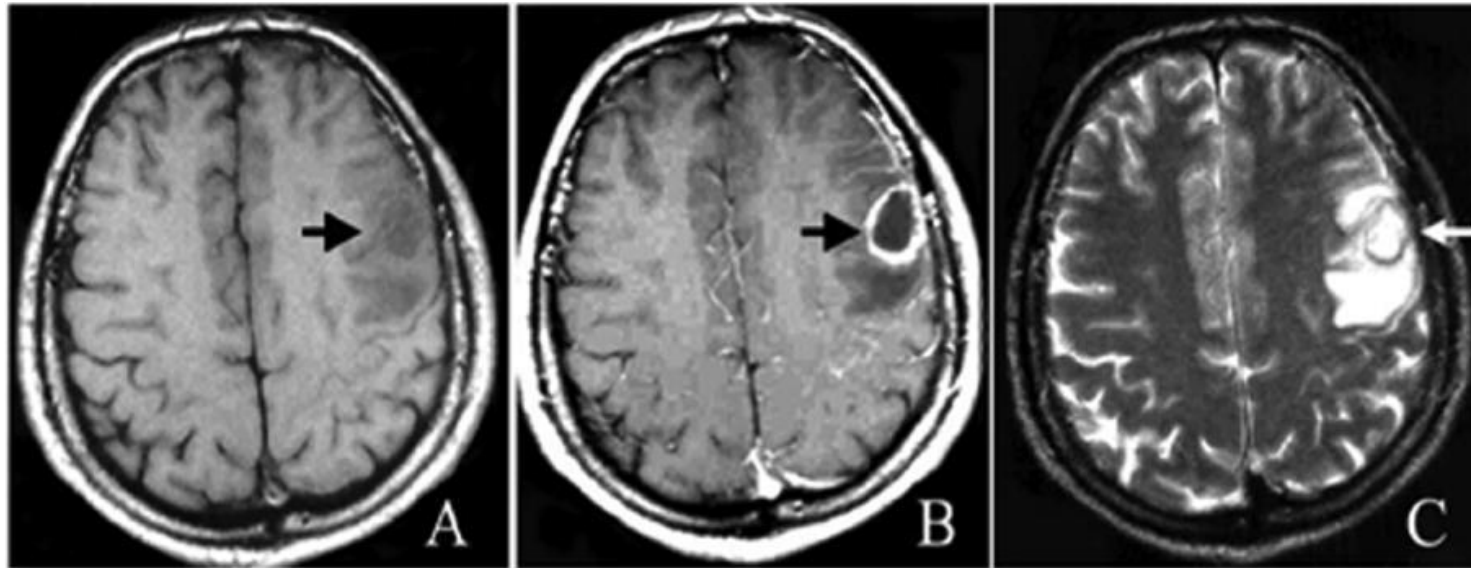


Стафилококковые инфекции : Респираторные

- Тонзиллит
- Фарингит
- Синусит
- Отит
- Бронхопневмония
- Абсцесс легких
- Эмпиема
- Пневмония (редко)

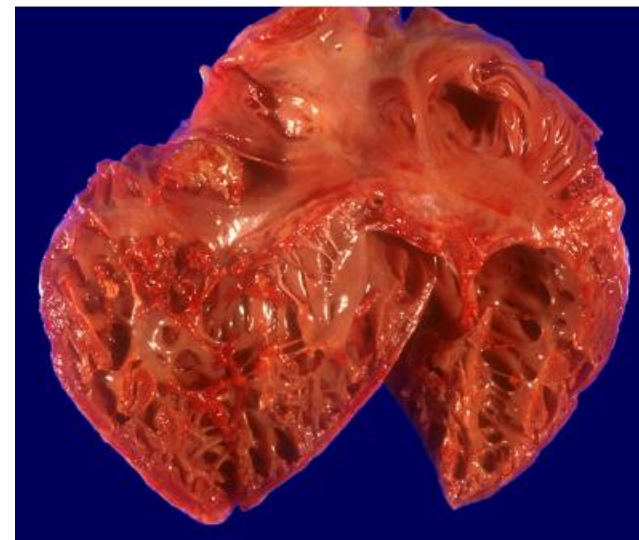
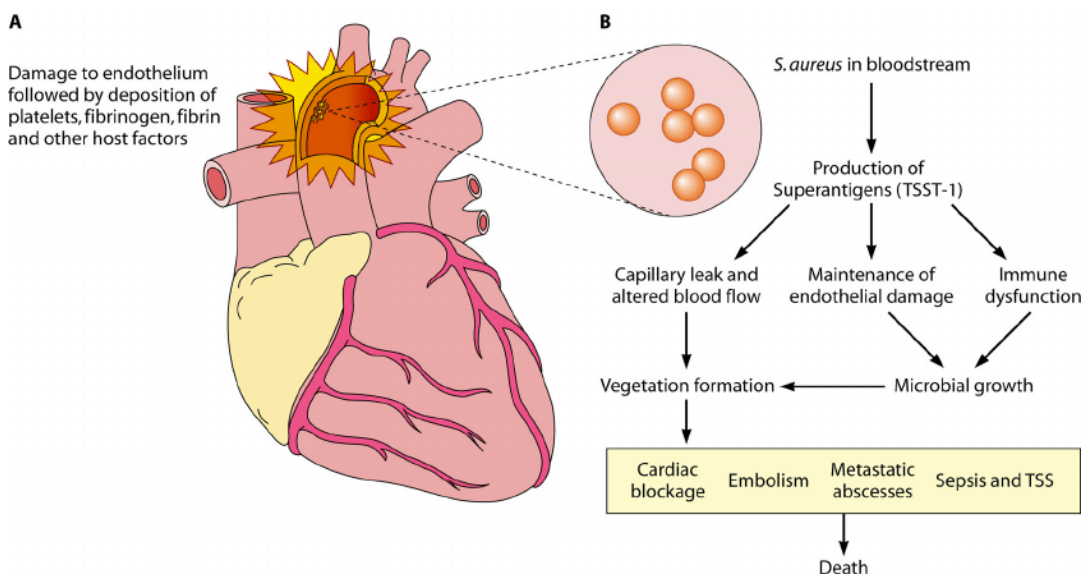
Стафилококковые инфекции : ЦНС

- Абсцесс
- Сенингит
- Внутрочерепной тромбофлебит



Стафилококковые инфекции : Эндоваскулярные

- Бактериемия
- Септицемия
- Пиэмия
- Эндокардит

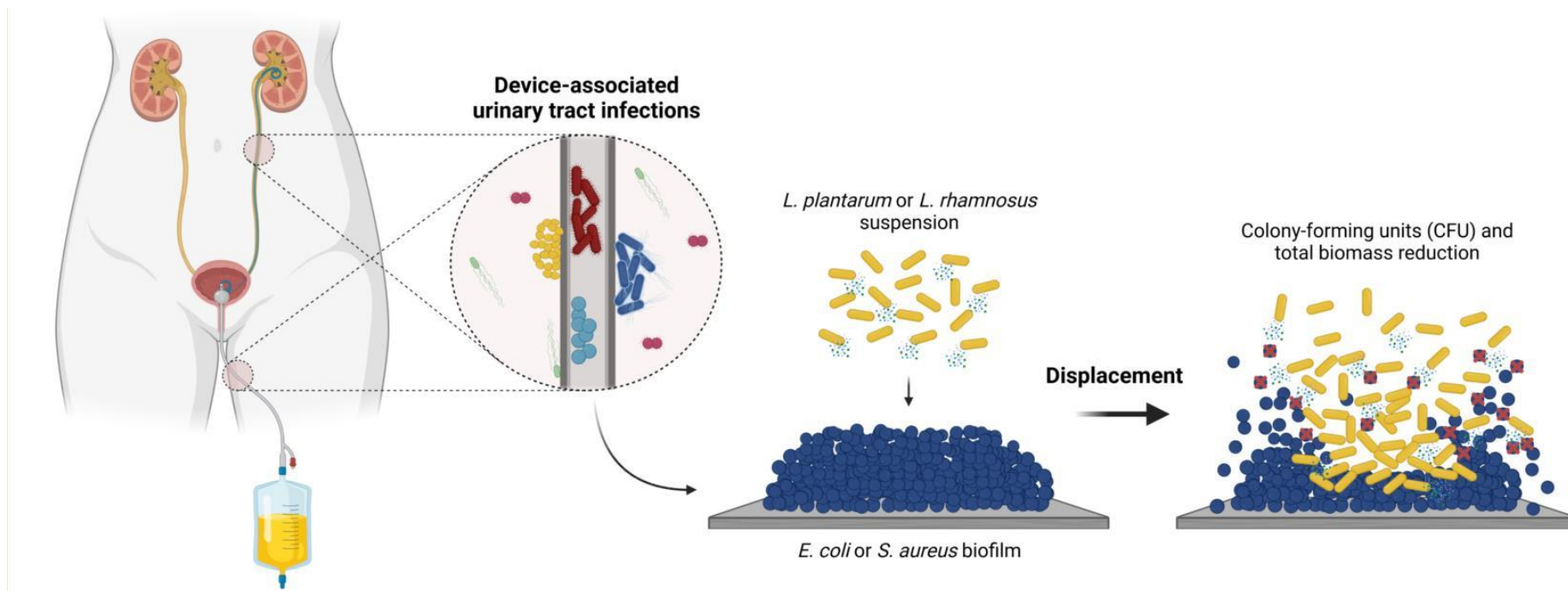


Стафилококковые инфекции: Эндоваскулярные

- *S. aureus* является наиболее частой причиной пневмонии у наркоманов, использующих наркотики внутривенно и пациентов с ГБ (болезнь Гентингтона).
- Наиболее частым возбудителем менингита после проникающих ранений является *S. aureus*.
- Является вторым по частоте возбудителем инфекций ЦНС (при шунтирующих инфекциях) после КНС.

Стафилококковые инфекции: Мочевыводящие пути

- Инфекции мочевых путей



Стафилококковые интоксикации

- Заболевание вызывается бактериальными экзотоксинами
 - синтезируется в организме инфицированного человека
 - ранее синтезированные in vitro
- **3 вида**
 - Пищевое отравление
 - Синдром токсического шока
 - Синдром «ошпаренной кожи»

Стафилококковые интоксикации: Пищевое отравление 1

- Энтеротоксин ответственен за проявления стафилококкового пищевого отравления
- В настоящее время известно восемь типов энтеротоксинов: А, В, С1-3, D, Е и Н.
- Обычно это происходит при попадании в организм с пищей, зараженной предварительно сформированным токсином.
- Токсин вызывает заболевание, непосредственно воздействуя на вегетативную нервную систему, а не на слизистую оболочку кишечника.

Стафилококковые интоксикации Пищевое отравление 2

- Основными продуктами питания являются молоко и молочные продукты, мясо, рыба и мороженое.
- Источник инфекции – работник пищевой промышленности, являющийся переносчиком
- Инкубационный период - 2-6 часов
- Клинические симптомы – тошнота, рвота и диарея.
- Заболевание обычно проходит самостоятельно в течение нескольких дней.
- Энтеротоксины (энтеротоксин В) могут вызывать энтероколиты у больных с нарушением иммунитета и кишечной флоры.

Стафилококковые интоксикации :

Стафилококковый Синдром токсического шока (STSS)

- STSS связан с инфекцией *S. aureus*, синтезирует TSST (ранее известный как энтеротоксин типа F), слизистых оболочек или секвестрированных участков.
- Это фатальное мультисистемное заболевание, характеризующееся лихорадкой, гипотензией, миалгией, рвотой, диареей, гиперемией слизистых оболочек и эритематозной сыпью, которая позднее шелушится.



Стафилококковые интоксикации:

Стафилококковый Синдром токсического шока(STSS)

- 2 вида STSS:
- **STSS**, связанный с менструацией: колонизация *S. aureus* происходит во влагалище женщины, которая во время менструации использует вагинальные тампоны с высокой впитывающей способностью
- Неменструальный **STSS**: колонизация *S. aureus* происходит в других местах, таких как операционная рана.

Стафилококковые интоксикации : «синдром ошпаренной кожи»(SSSS)

- Ответственным за заболевание является эксфолиативный токсин, синтезируемый *S. aureus*.
- Это кожное заболевание, характеризующееся отделением наружного слоя эпидермиса от подлежащих тканей.

Стафилококковые интоксикации : «синдром ошпаренной кожи»(SSSS)

SSSS :

	<u>Тяжелая форма</u>	<u>Легкая форма</u>
У новорожденных-	болезнь Риттера	Pemfigus neonatorum
У взрослых-	Токсический эпидермальный некролиз	Буллезный импетиго



Болезнь Риттера



Pemphigus neonatorum



Токсический эпидермальный некролиз



Буллезный импетиго

Болезнь Риттера – наблюдают у новорожденных , инфицированных стафилококковыми штаммами , продуцирующими эксфолиатины . На коже образуются пузыри (**синдром «ошпаренной кожи»**) и эрозированные участки .



Staphylococcus aureus: заболевания

- **Токсины**

- Пищевое отравление,
- Синдром «ошпаренной кожи»
- Синдром токсического шока

- **Кожа**

- Карбункул
- Фолликулит
- Фурункул
- Импетиго
- Раневые инфекции

- **Другие**

- Бактериемия
- Эндокардит
- Пневмония
- Эмпиема
- Остеомиелит
- Септический артрит

Staphylococcus epidermidis: заболевания

- Бактериемия
- Эндокардит
- Хирургические раны
- Инфекции мочевых путей
- Оппортунистические, катетер, шунт, протез и перитонеальный диализат инфекции

Иммунитет

- Люди обладают естественной устойчивостью к стафилококковым инфекциям.
- Эта устойчивость обеспечивается барьерными функциями кожи и слизистых оболочек, фагоцитозом и естественными антителами.
- Приобретенный иммунитет слаб и неустойчив, поэтому не защищает от повторных заболеваний.

Микробиологическая диагностика

➤ *Выбор материала для исследования основан на локализации патологического процесса.*

- Гной
- Кровь
- Цереброспинальная жидкость(ликвор)
- Мокрота
- Мазок из носовой полости и зева
- Рвотные массы
- Моча
- Кал



микробиологическая диагностика стафилококковых инфекций:



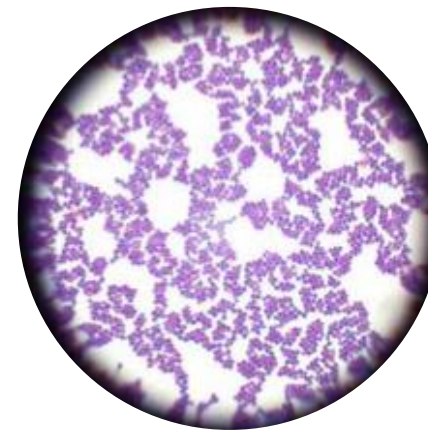
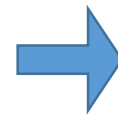
➤ *Микроскопический*

- приготовление мазка из патологического материала
- микроскопия мазка, окрашенного по Граму
- стафилококки в мазке могут располагаться поодиночке, парами, тетрадами и в виде коротких цепочек

➤ *Бактериологический (культуральный)*

- первичная инокуляция патологического материала в питательные среды
- инкубация при температуре 37°C в течение 18-24 часов
- идентификация выделенной культуры по морфологическим, культуральным, биохимическим свойствам
- определение чувствительности к антибиотикам

Бактериологический метод:



- Гемолиз на кровяном агаре
- Каталазный тест
- Лецитиназный тест
- Плазмокоагулазный тест и др .



Окончательный ответ:
выделение *Staphylococcus aureus*

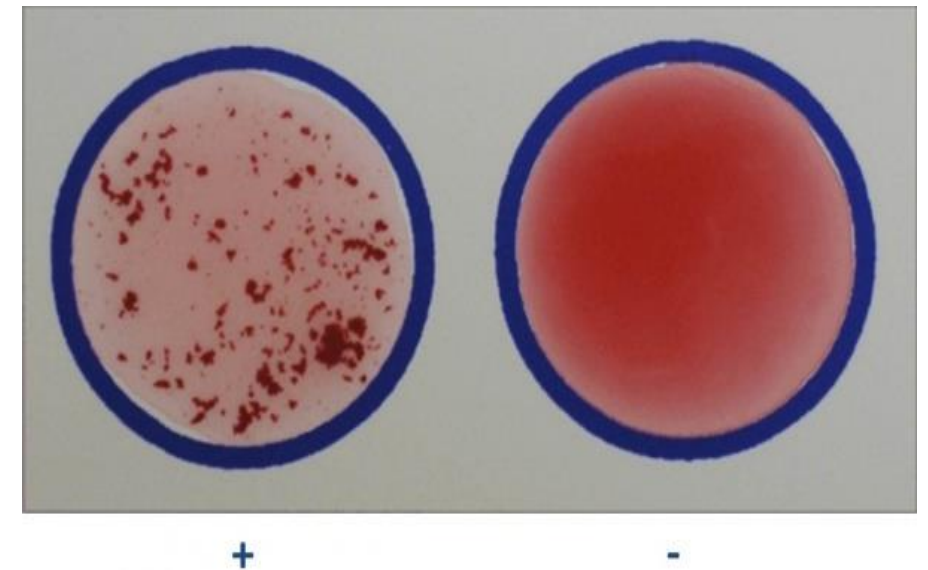


Результаты определения
чувствительности к
антибиотикам

Микробиологическая диагностика :

➤ Латекс тесты:

- а) При смешивании пропитанных фибриногеном латексных частиц с суспензией стафилококковой культуры на предметном стекле происходит слипание *S. aureus* и наблюдается эффект агглютинации.
- б) При смешивании суспензии пропитанных иммуноглобулином частиц латекса с культурой стафилококка на предметном стекле наблюдается агглютинация, если эта культура принадлежит *S. aureus*. Этот тест отличается от теста на коагулазу. Здесь **белок А** в клеточной стенке *S. aureus* присоединяется к иммуноглобулину на частицах латекса, при этом возникает эффект агглютинации.

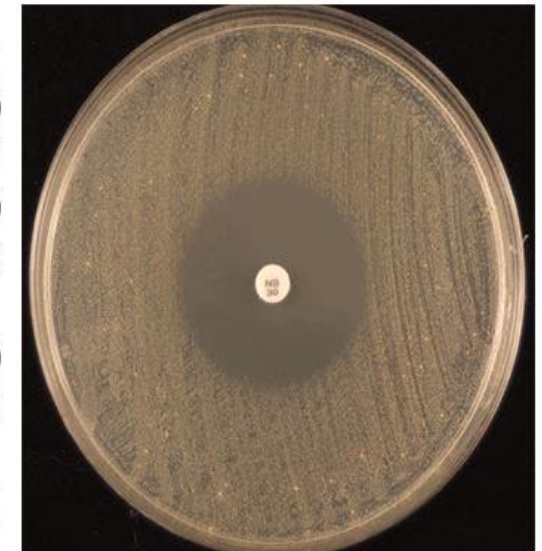


Идентификация стафилококков с использованием тестов на чувствительность к некоторым антибиотикам:

- **Тест на чувствительность к новобиоцину** - *S.saprophyticus* устойчивый, *S.aureus*, *S.epidermidis* и множество коагулаза негативных стафилококков чувствительны. (КНС)



Staphylococcus saprophyticus
Resistant (less than 16 mm)



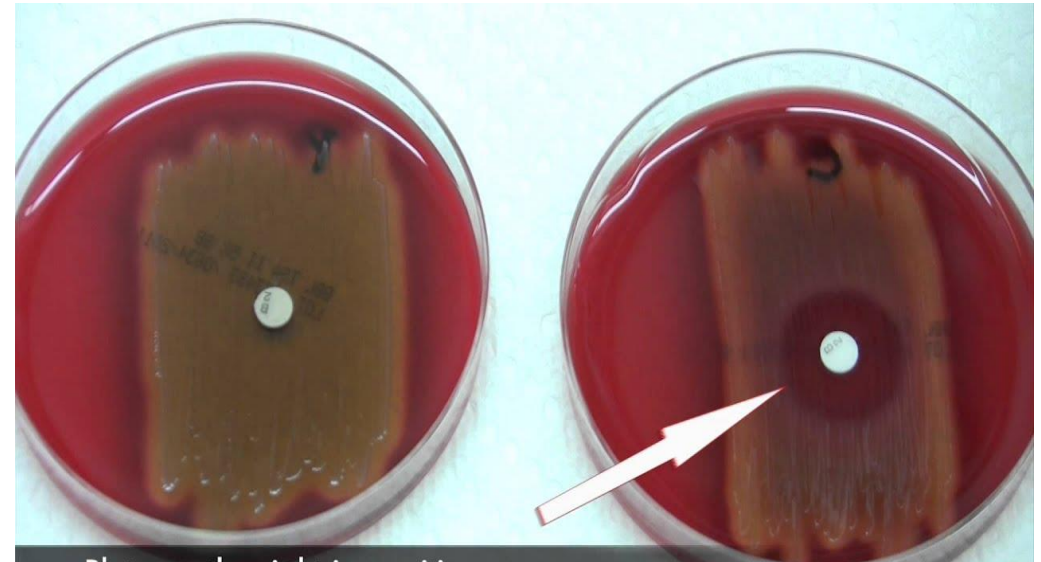
Staphylococcus aureus
Sensitive (greater than 16 mm)

NOVOBIO-CIN

Идентификация стафилококков с использованием тестов на чувствительность к некоторым антибиотикам:

- **Тест на чувствительность к полимиксину** основан на том, что коагулазоположительные стафилококки устойчивы к определенным концентрациям полимиксина, в то время как другие виды стафилококков чувствительны.
- **Тест на чувствительность к бацитрацину** - все коагулазонегативные стафилококки (КНС) устойчивы к 0,04 В бацитрацина, а микрококки чувствительны. После культивирования бактерии в соответствующей питательной среде на нее помещают диск с бацитрацином. После инкубации оценка основывается на зоне вокруг диска. Зоны 7 мм считаются чувствительными.

Basitrasinə həssaslıq testi



KNS davamlı

Mikrokok həssas

Автоматизированные системы идентификации и определения чувствительности к антибиотикам:

- **Rapidec Staph (Bio-Merieux-Vitek)** – кит используется для различения видов *S.aureus*, *S.epidermidis* и *S.saprophyticus*, дает результаты в течение 2 часов и состоит из 4 куполов.
- **API STAPH-IDENT** – Кит полезен для идентификации 17 видов и подвидов стафилококков с помощью использования 10 биохимических тестов.
- **API STAPH (Biomérieux-Vitek)** – Представляет собой стрип для идентификации микрококков и стафилококков, дающий результаты через 18-24 часа.
- **ID 32 STAPH (Bio Merieux)** – При помощи этого стрипа, состоящего из 32 куполов, идентификацию микрококков проводят в течение 24 часов.
- **MINITEK GRAM POSITIVE PANEL (BD Microbiology System)** – Это система, состоящая из сухих дисков, пропитанных различными тест-субстратами, используется при идентификации микрококков, стафилококков и стрептококков.

Biomerieux VITEK-2 - бактериологический анализатор

- Vitek-2 Compact – автоматическая система
- Проводит идентификацию микроорганизмов
- Определяет чувствительность микроорганизмов к антимикробным препаратам (в течение 1 дня)
- имеет пластиковую карту с 64 лунками
- Результат – через 6-8 часов



Biomerieux VITEK-2



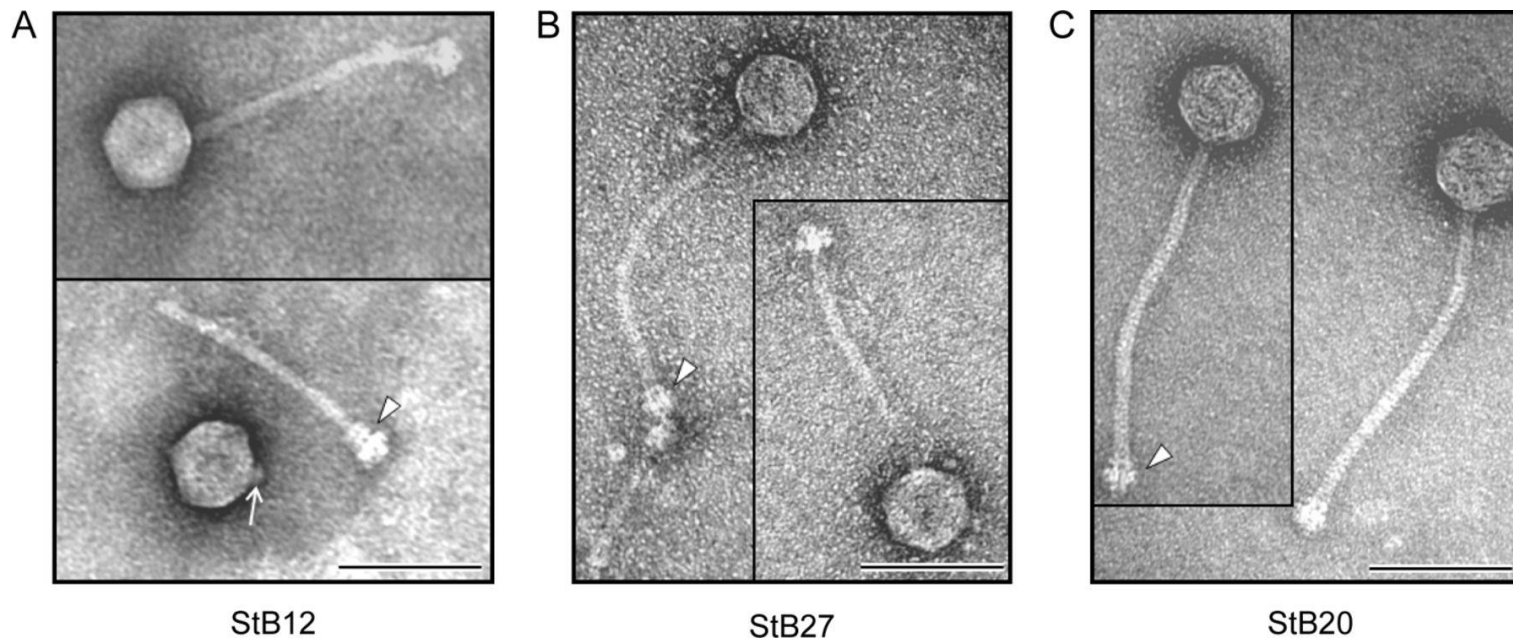
*Идентификация
видов (ID) **карты***



*Тест на антимикробную
чувствительность-
(**стрипы**)*

Типирование с помощью бактериофагов

- Типирование *S. aureus* бактериофагами важно с точки зрения мониторинга эпидемиологии внутрибольничных инфекций.



Бактериофаг *S. aureus*

Лабораторный диагноз: Методы идентификации

- Окрашивание по Граму
- Наличие пигмента
- Каталазный тест
- Ферментация глюкозы
- Тест на коагулазу
- Латексные тесты
- Дезоксирибонуклеазный тест (ДНКазный тест)
- Тест на чувствительность к лизостафину
- Образование липкого вещества
- Тест на щелочную фосфатазу
- Тест на гемолиз
- Идентификация стафилококков с помощью некоторых тестов на чувствительность к антибиотикам
- Тест на чувствительность к новобиоцину
- Тест на чувствительность к полимиксину
- Тест на чувствительность к бацитрацину
- Автоматизированные системы

Лечение и профилактика:

Специфическое лечение — используют антибиотики широкого спектра действия (ампициллин - сульбактам) до определения чувствительности возбудителя к антибиотикам.

При специфическом лечении используют стафилококковый анатоксин и антистафилококковый иммуноглобулин.

Специфическая профилактика — проводится с использованием стафилококкового анатоксина и антистафилококкового иммуноглобулина.



Семейство Streptococcaceae (таксономия)

- **Домен** (Domain): Бактерии
- **Царство** (Kingdom): Bacillota
- **Клас** (Class): Bacilli
- **Отряд** (Order): Lactobacillales
- **Семейство** (Family): Streptococcaceae
- **Род** (Genus): Streptococcus
 - Floricoccus
 - Lactococcus
 - Lactovum
 - Okadaella
 - **Streptococcus**
 - **Вид** (Species):
S.pyogenes,
S.pneumoniae,
S.viridans,
S.agalactiae и др.

Стрептококки (классификация)

Семейство *Streptococcaceae* включает роды:

- *Streptococcus*
- *Enterococcus*
- *Aerococcus*
- *Leuconostoc*
- *Pediococcus*
- *Lactococcus*



Streptococcus

Стрептококки (классификация)

Классификация по культуральным свойствам :

- Строгие анаэробы (Род *Peptostreptococcus*)
- Аэроб
- Факультативные анаэробы

Классификация по гемолитической активности на кровяном агаре:

- *альфа-гемолитические стрептококки* - (расщепление гемоглобина в метгемоглобин)
- *бета-гемолитические стрептококки* - (полный гемолиз эритроцитов)
- *гамма-гемолитические стрептококки* - (негемолитические стрептококки , визуально не видимый гемолиз)



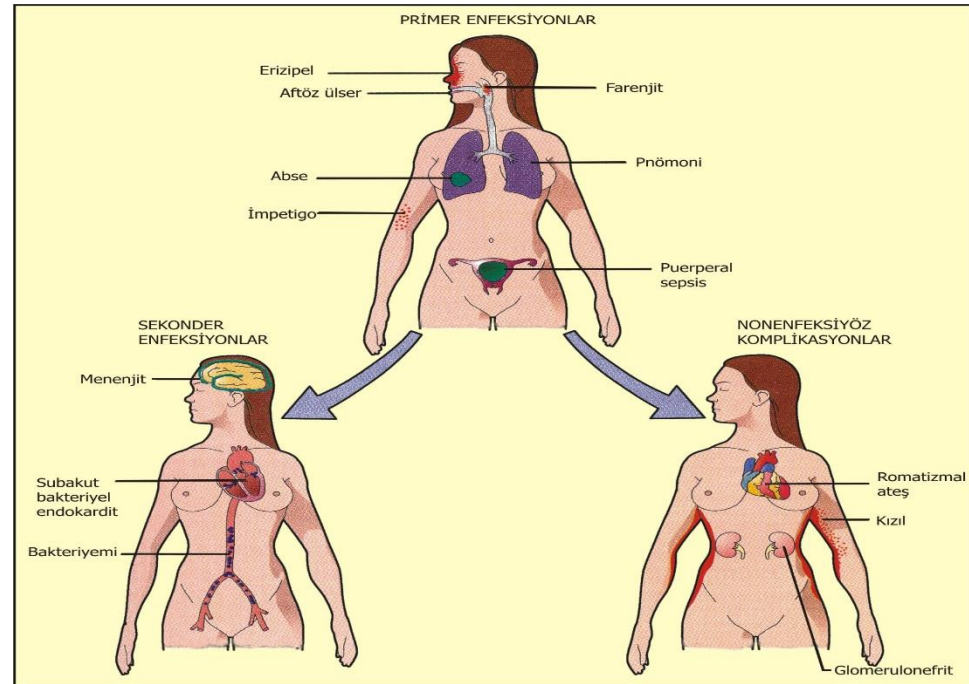
Стрептококки (классификация)

Классификация по антигенной структуре (по Р.Ленсфилд):

- основана на наличии ***C-полисахаридов*** в клеточной стенке аэробных стрептококков . В соответствии с этим выделяют 20 серогрупп – А, В, С, D, E, F, G, H, K, L, M, N, O, P, Q, R, S, T, U, V .
- в патологии человека основная роль принадлежит бета-гемолитическим стрептококкам серогруппы А - *Streptococcus pyogenes* .

Стрептококки (классификаци:

- **Альфа-гемолитические**
 - Pneumococci
 - Viridans группа: альфа-гемолитические
- **Beta-гемолитические**
 - Группа A
 - Группа B
 - Группа C
 - Группа D (энтерококки)
 - Группа F стрептококки
 - Группа G стрептококки
 - Группа H стрептококки



Стрептококки медицинского значения

Species	Host	Disease
S. pyogenes	Человек	фарингит, целлюлит, erisipelas
S. agalactiae	Человек, животные	Неонатальный менингит и сепсис
S. dysgalactiae	Человек, животные	Эндокардит, бактериемия, пневмония, менингит, респираторные заболевания
S. gallolyticus	Человек, животные	Инфекции желчных и мочевыводящих путей, эндокардит
S. anginosus	Человек, животные	субкутанные/органные абсцессы, менингит, респираторные заболевания
S. sanguinis	Человек	эндокардит, кариес
S. suis	свинья	менингит
S. mitis	Человек	эндокардит
S. mutans	Человек	кариес
S. pneumoniae	Человек	пневмония

Морфо-биологические свойства:

Род Streptococcus — грамположительные бактерии сферической формы, диаметром 1 мкм, неподвижны, спор не образуют. В мазках из чистой культуры могут располагаться попарно или цепочками.



Streptococcus pyogenes – культуральные свойства:

S. pyogenes – требовательны к питательным средам

Растут на сложных питательных средах с добавлением крови, сыворотки, асцитической жидкости, углеводов.

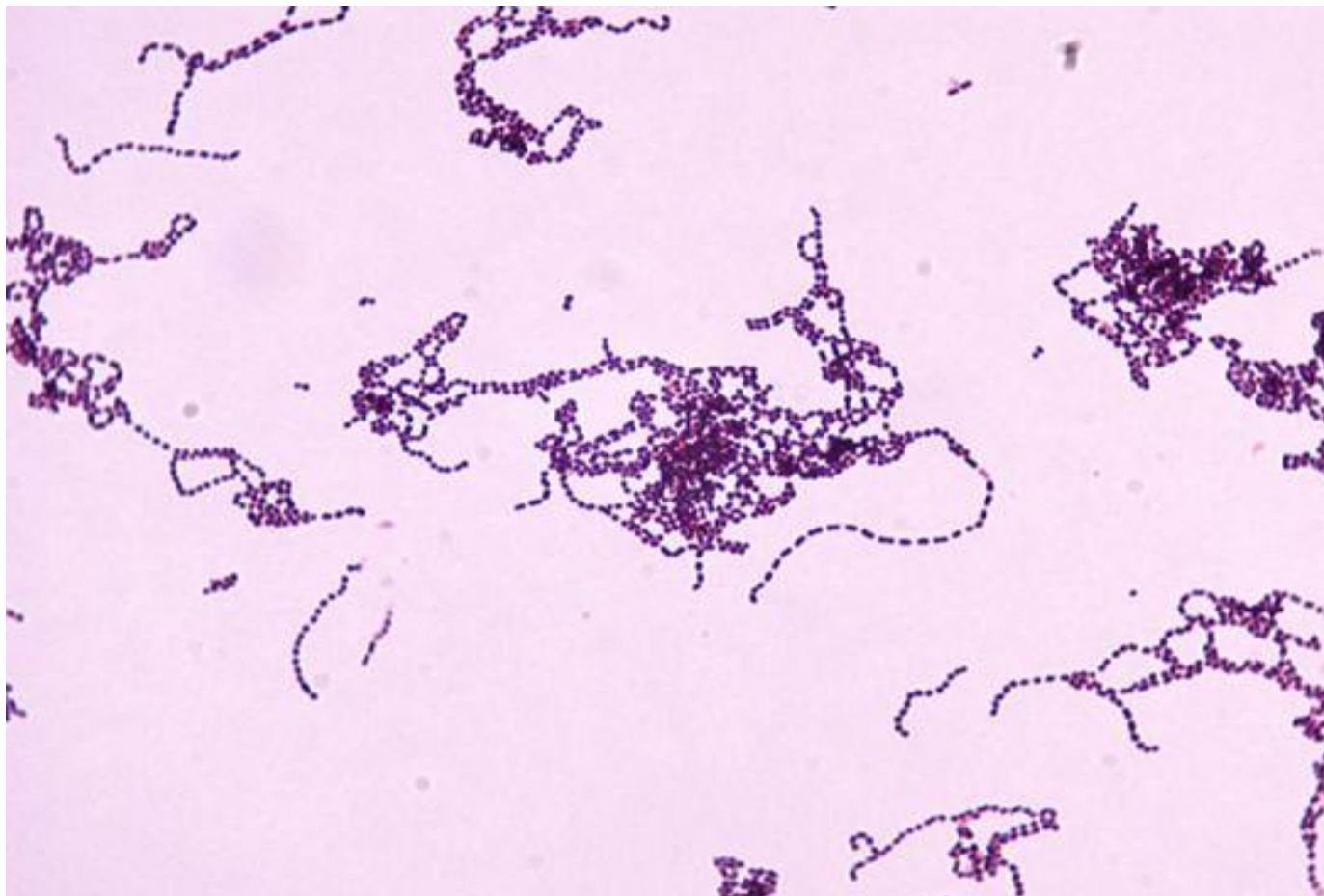
При росте на плотных питательных средах образуют мелкие, плоские, сероватые, мутные колонии диаметром около 1 мм (S-колонии). На жидких средах дают помутнение и небольшой хлопьевидный осадок.

На кровяном агаре вызывают *бета-гемолиз*.



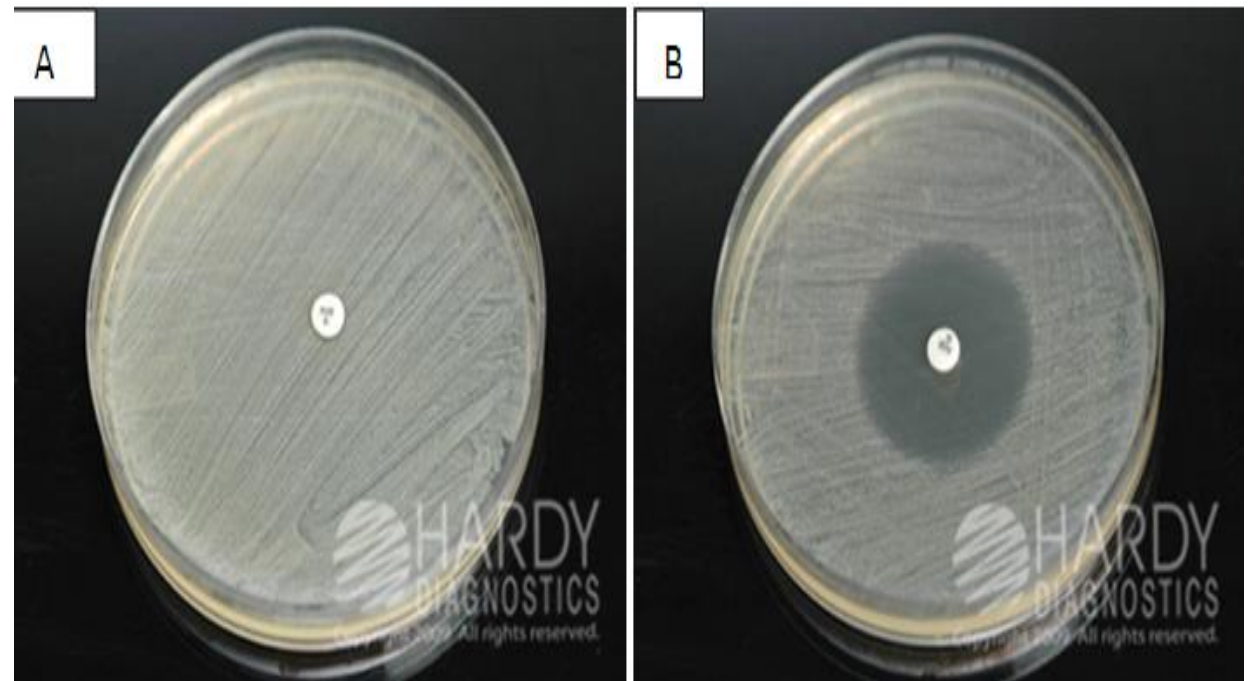
Streptococcus pyogenes

(в мазке из чистой культуры, окраска по Граму)



Биохимические свойства стрептококков :

<i>Признак</i>	<i>S.pyogenes</i>
Гемолитическая активность	бета-гемолиз
Каталаза	-
Глюкоза	+
Лактоза	+
Сахароза	+
Мальтоза	+
Маннит	+
Инулин	-
Сбраживают молоко	+
Разжижают желатин	-
Образуют индол	-



Бацитрациновый тест

Стрептококки группы В устойчивы
Стрептококки группы А чувствительны

Streptococcus pyogenes –антигенная структура

- **Видоспецифический антиген** - нуклеопротеид, расположенный в цитоплазме
- **Группоспецифические антигены** - полисахариды клеточной стенки.
- **Типоспецифические антигены (M -,T-, R-)** - белковые антигены наружного слоя клеточной стенки.

Streptococcus pyogenes (факторы патогенности)

■ Компоненты клеточной стенки:

микрокапсула
липотейхоевая кислота
М-протеин

■ Ферменты патогенности:

гиалуронидаза
дезоксирибонуклеаза (ДНК-аза)
никотинадениндинуклеотидаза(НАД-аза)
стрептокиназа
С5а -пептидаза

Токсины :

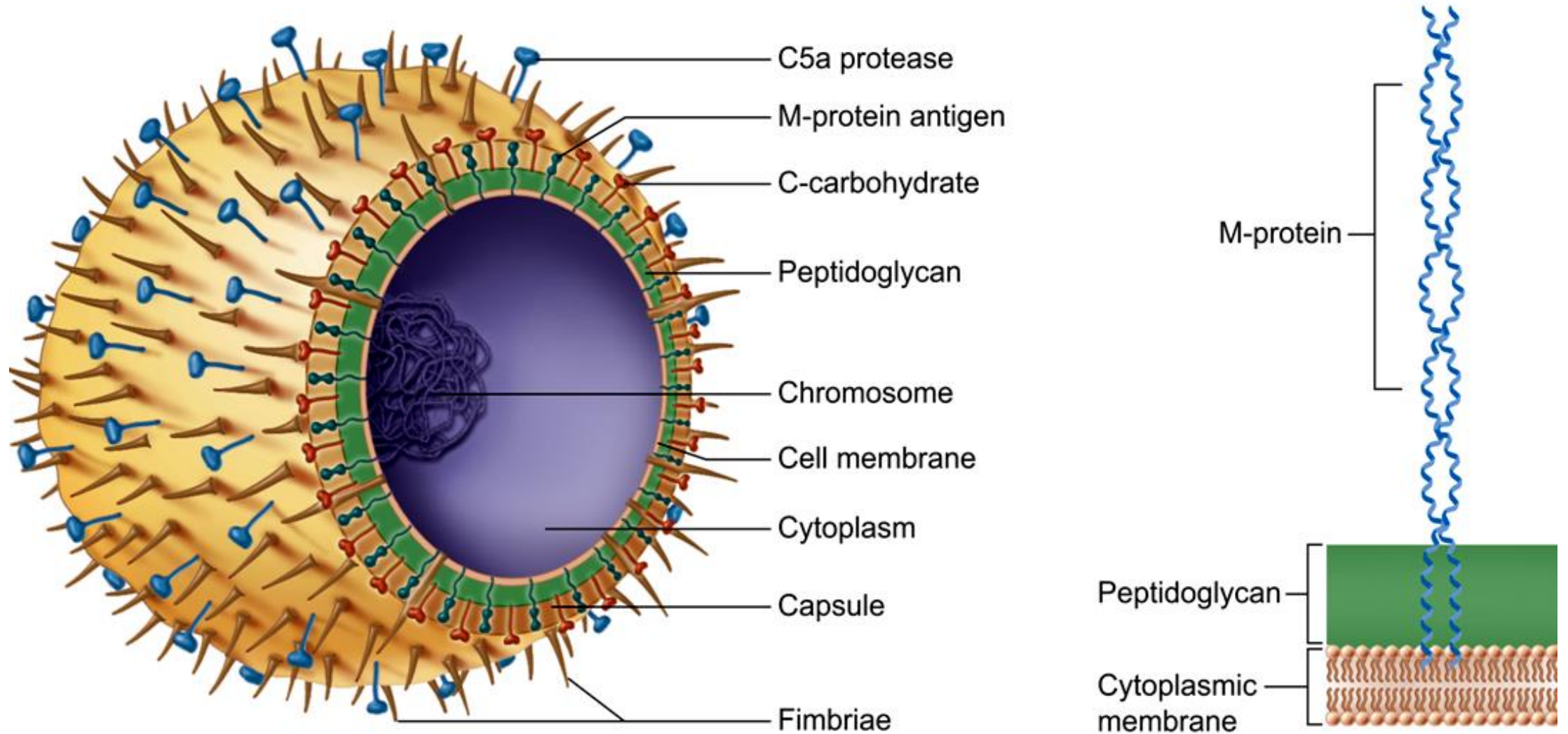
Стрептолизин -О - белок, проявляет иммуногенные свойства, чувствителен к кислороду, вызывает гемолиз в глубине кровяного агара, имеет диагностическое значение (антистрептолизин-О - ASO)

Стрептолизин-S - не обладает антигенностью, устойчив к кислороду, вызывает поверхностный гемолиз на кровяном агаре

Пирогенный (эритрогенин)токсин - играет важную роль в патогенезе скарлатины .

Streptococcus pyogenes

(локализация М-протеина и других факторов патогенности)



Эпидемиология стрептококковых инфекций:

Источник инфекции: больные люди и бактерионосители

Механизм и пути заражения: воздушно-капельный, воздушно-пылевой, пищевой, контактный.

Стрептококковые инфекции:

Острые стрептококковые инфекции:

скарлатина

рожа

ангина

импетиго

сепсис

Острый гломерулонефрит

Острый и подострый бактериальный

эндокардит

Хронические стрептококковые инфекции:

ревматизм

хронический тонзиллит

Гнойные инфекции - (ангина, тонзиллит, абсцес , импетиго и др.)

Негнойные инфекции - (скарлатина, рожа, ревматизм , острый гломерулонефрит)

*Негнойные инфекции
стрептококковой этиологии:*

*Рожа
«erysipelas»*



Импетиго



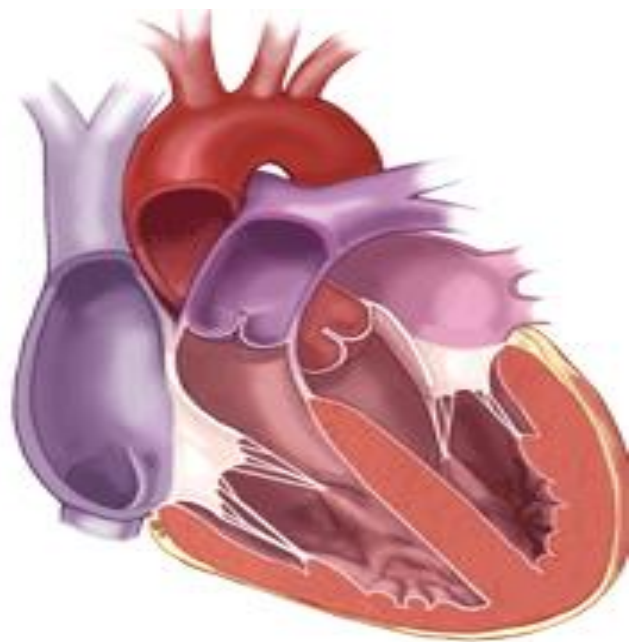
Негнойные инфекции :

Скарлатина

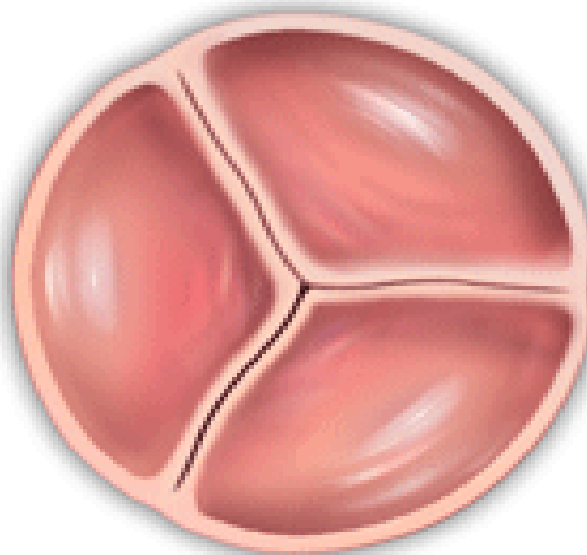


Негнойные инфекции стрептококковой этиологии:

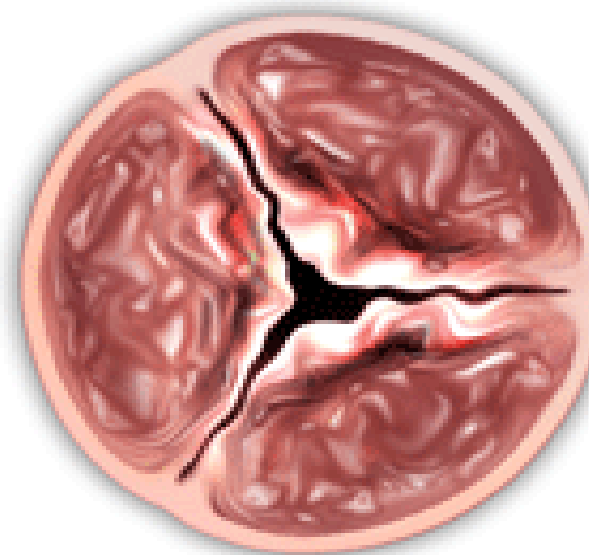
*поражение клапанов сердца бета-гемолитическими стрептококками
серогруппы А (S.pyogenes) при ревматизме*



Сокращение сердца в норме



Клапаны сердца в норме

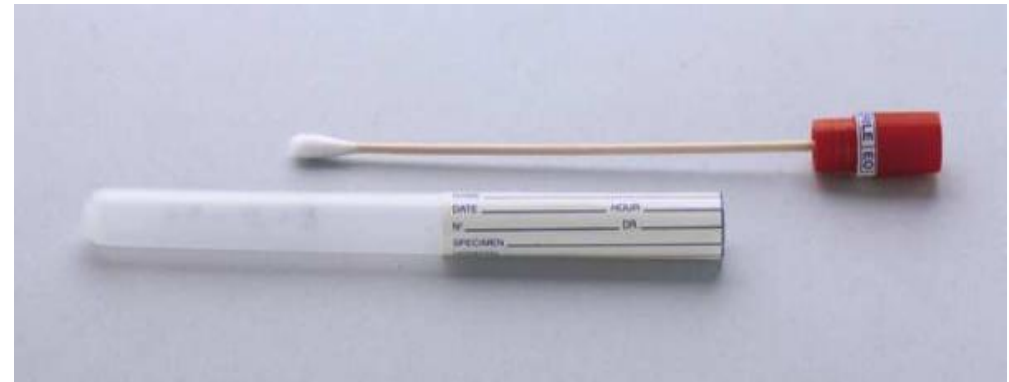


Клапаны сердца с дефектом

Микробиологическая диагностика стрептококковых инфекций:

Материалы для исследования:

- кровь
- гной
- отделяемое из ран
- спинномозговая жидкость (ликвор)
- мокрота
- слизь из носа и зева
- рвотные массы
- испражнения
- моча



Микробиологическая диагностика стрептококковых инфекций:

```
graph TD; A[Микробиологическая диагностика стрептококковых инфекций:] --> B[Гнойно-воспалительные инфекции]; A --> C[Негнойные инфекции]; B --> D[Бактериологический (культуральный) метод]; C --> E[Серологический метод]; D --> F[• посев исследуемого материала на специальные питательные среды]; D --> G[• инкубация при температуре 37°C на 18-24 часа]; D --> H[• Выделение чистой культуры и идентификация по морфологическим, культуральным, гемолитическим и биохимическим свойствам]; D --> I[• Реакция Ленсфилд (реакция преципитации в жидкой среде для определения серогруппы)]; D --> J[• Определение чувствительности на антибиотики]; E --> K[• РСК (реакция связывания комплемента — определение антител в сыворотке к стрептококковым антигенам)]; E --> L[• Реакция нейтрализации — (определение стрептококковых антител к токсинам-стрептолизину О или стрептодорназе)];
```

Гнойно-воспалительные инфекции

Бактериологический (культуральный) метод

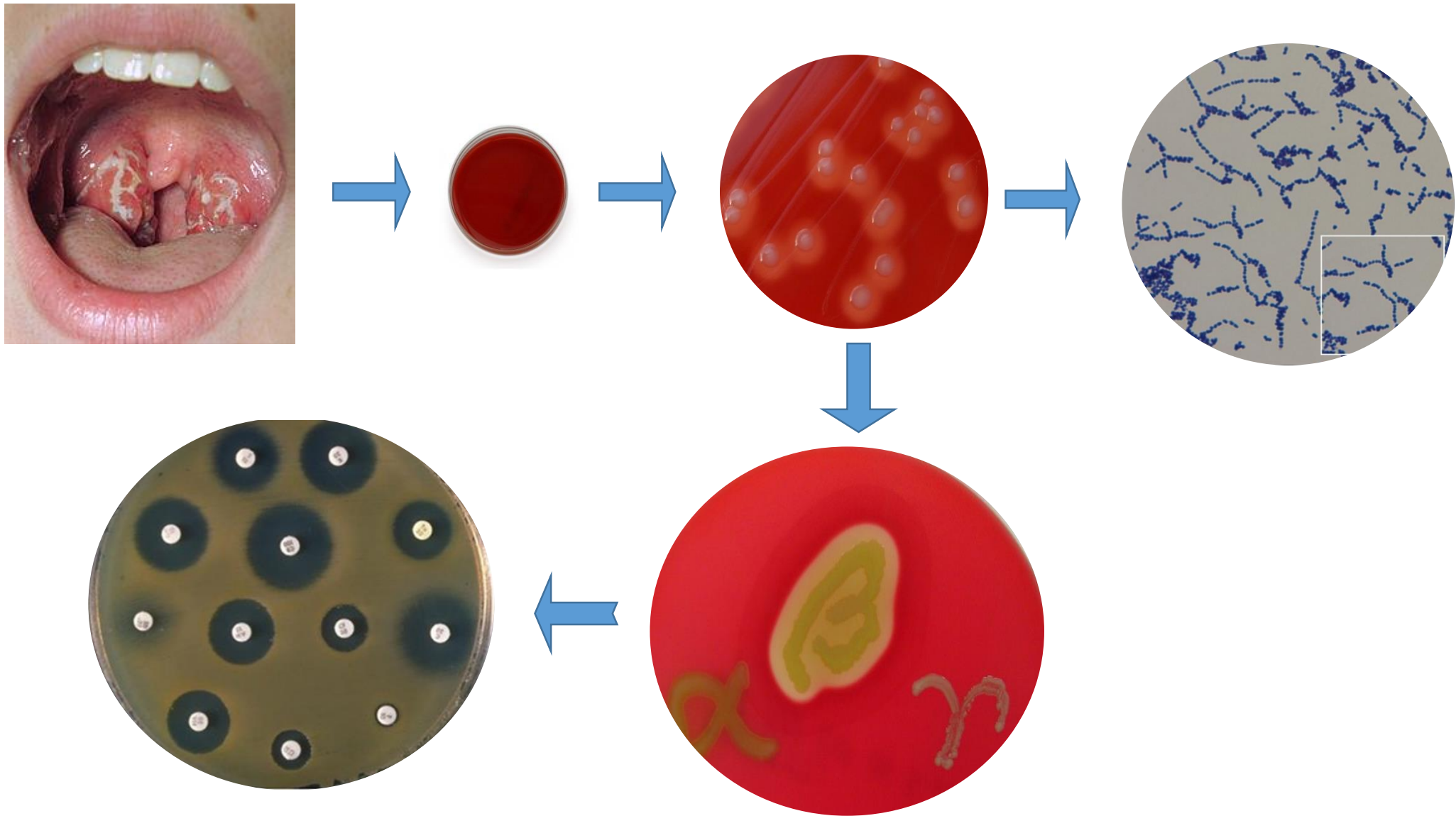
- посев исследуемого материала на специальные питательные среды
- инкубация при температуре 37°C на 18-24 часа
- Выделение чистой культуры и идентификация по морфологическим, культуральным, гемолитическим и биохимическим свойствам
- *Реакция Ленсфилд (реакция преципитации в жидкой среде для определения серогруппы)*
- Определение чувствительности на антибиотики

Негнойные инфекции

Серологический метод

- *РСК* (реакция связывания комплемента — определение антител в сыворотке к стрептококковым антигенам)
- *Реакция нейтрализации* — (определение стрептококковых антител к токсинам-стрептолизину О или стрептодорназе)

Бактериологический метод исследования:



Микробиологическая диагностика стрептококковых инфекций:

Серологический метод:

- **РСК** (реакция связывания комплемента) - в сыворотке крови определяются антитела к стрептококковому антигену.
- **Реакция нейтрализации**- (определяются антитела против стрептококковых токсинов - стрептолизин О и стрептодорназа).
- **Коаггутинация, латекс-агглютинация и ELISA** (*enzyme-linked immunosorbent assay*) - при определении **антигенов** бета-гемолитических стрептококков группы А в материале, взятом из мокроты, диагноз заболевания можно установить до 75% случаев.

Экспресс-методы выявления стрептококков:

- Готовится суспензия в 4 McFarland в 2 мл стерильной дистиллированной воды из колоний, культивированных анаэробно при 35°C в течение 24-48 часов на колумбийском агаре с овечьей кровью. Из этой суспензии материал культивируется в лунках системы **RapidID 32 Strep**. После инкубации при 37°C в течение 4 часов результаты оценивают с помощью прибора API-bioMerieux ATB 152D и, при необходимости, компьютера.



rapid 32 Strep

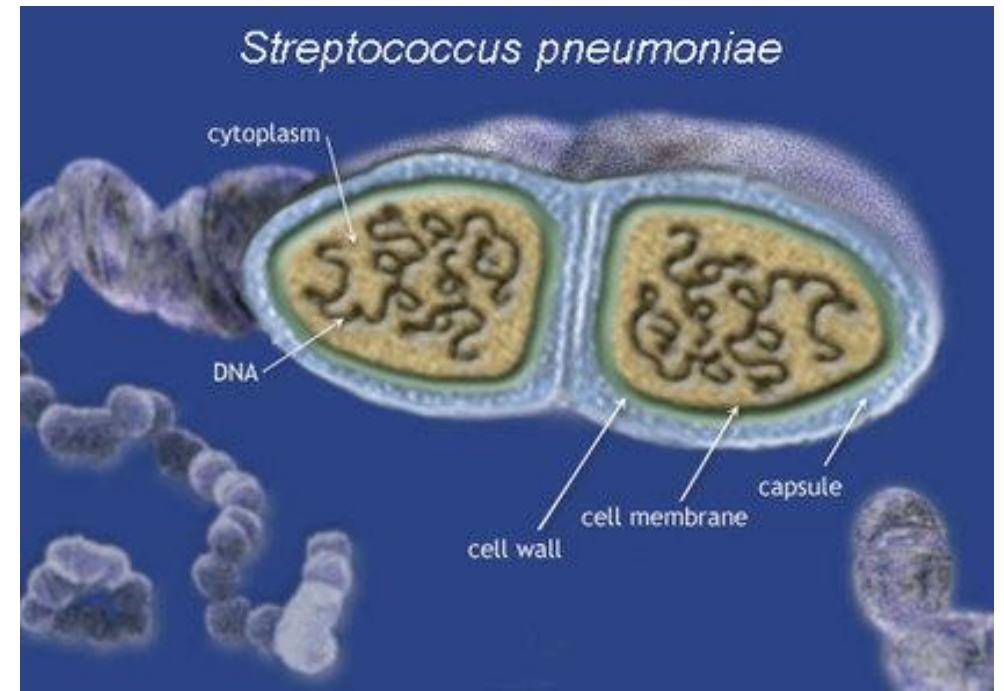
Лечение и профилактика:

- При этиотропном лечении применяют пенициллин, макролиды и тетрациклины.
- Специфического лечения и профилактики нет!

Streptococcus pneumoniae

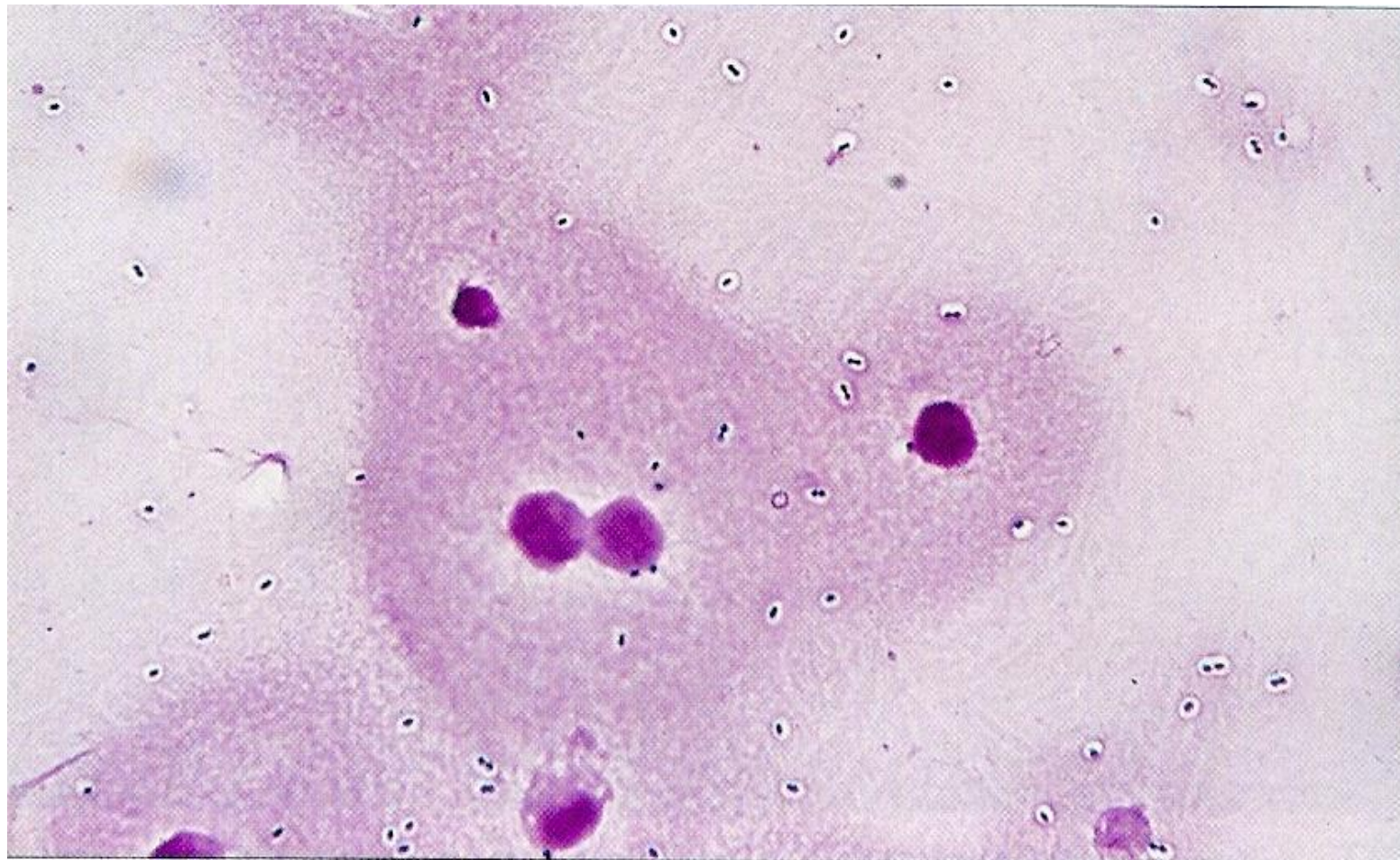
Морфо-биологические особенности:

Грамположительные —овальные или ланцетовидные диплококки диаметром до 1 мкм. Неподвижные, спор не образуют, с полисахаридной капсулой. Обнаруживаются в мазке, приготовленном из чистой культуры, виде цепочек.



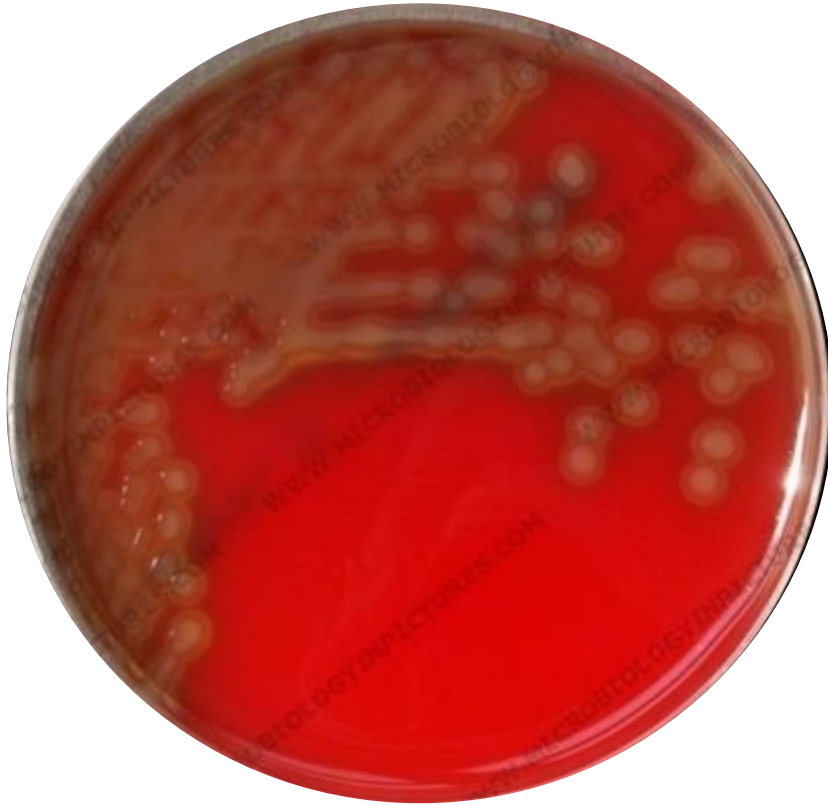
Streptococcus pneumoniae

(ланцетовидные диплококки в мазке из мокроты, окрашенном по Граму)



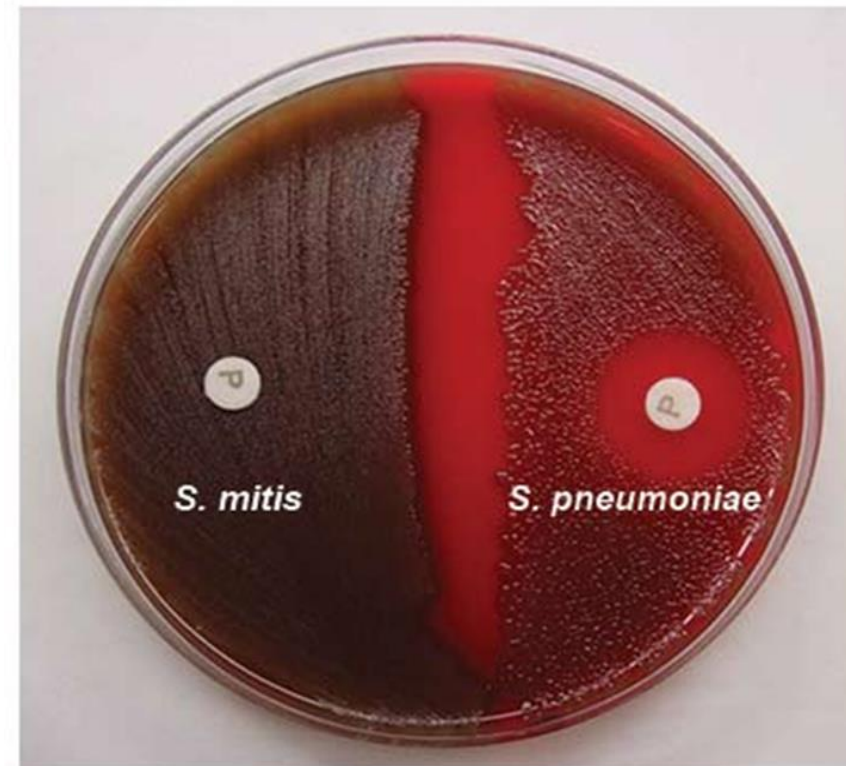
Streptococcus pneumoniae – культуральные свойства:

На сывороточных средах образуют мелкие, нежные и прозрачные колонии около 1 мм в диаметре ; иногда они могут быть плоскими с центральным углублением . На кровяном агаре колонии окружает зона гемолиза в виде зеленоватой обесцвеченной зоны (**альфа-гемолиз**). В бульоне с глюкозой дают равномерное помутнение и небольшой хлопьевидный осадок.



Ферментативная активность стрептококков:

Признак	<i>S.pneumoniae</i>
Гемолитическая активность	альфа-гемолиз
Каталаза	-
Глюкоза	+
Лактоза	+
Сахароза	+
Мальтоза	+
Маннит	+
Инулин	+
Сбраживание молока	-
Гидролиз желатина	-
Образование индола	-



ОПТОХИНОВЫЙ тест

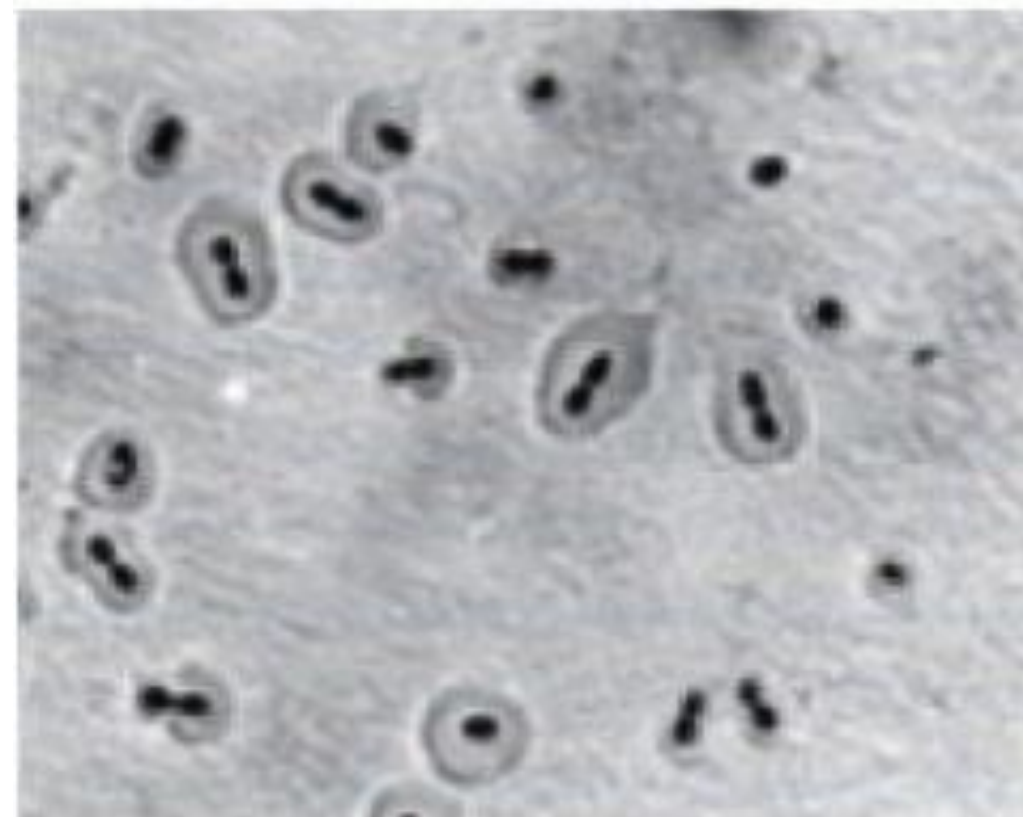
S.mitis - устойчив

S.pneumoniae - чувствителен

Streptococcus pneumoniae – антигенное строение

Клеточная стенка содержит полисахаридный антиген (С-вещество). По полисахаридному антигену в капсуле пневмококки делятся более чем на 90 сероваров. Серовары 1 и 8 чаще встречаются у людей. В организме образуются антитела против капсульных антигенов.

Реакция «*Quelling*» - реакция выявления капсул пневмококков, основанная на их набухании в присутствии специфических агглютинирующих АТ.



реакция «Quelling»

Streptococcus pneumoniae

(факторы патогенности)

➤ *Компоненты клетки :*

капсула

клеточная стенка (С-субстанция)

➤ *Ферменты агрессии :*

гиалуронидаза

нейраминидаза

➤ *Токсины :*

гемолизин

лейкоцидин

Эпидемиология пневмококковых инфекций :

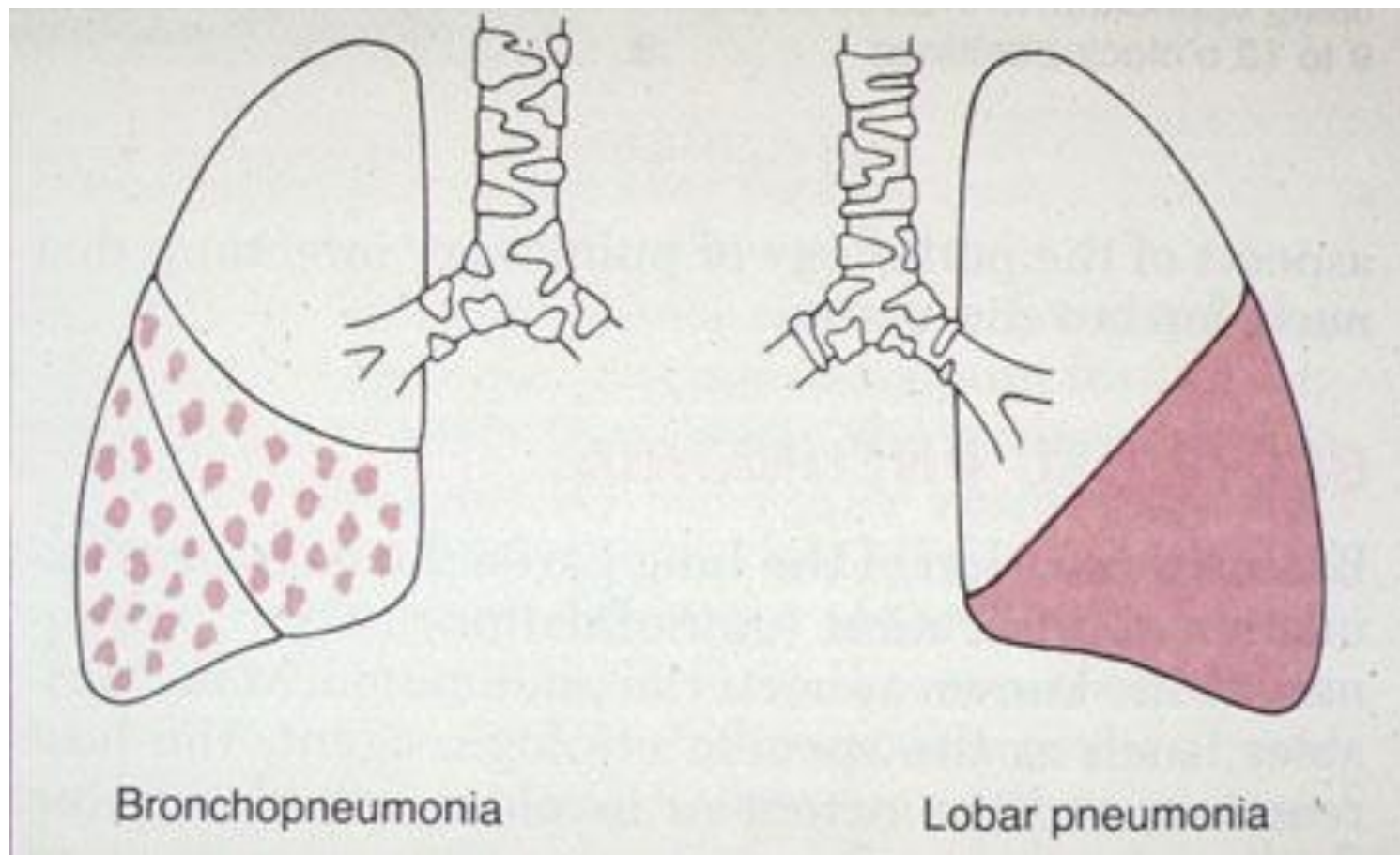
Источник инфекции: больные люди и бактерионосители

Пути передачи: воздушно-капельный, воздушно-пылевой

Клинические формы пневмококковых инфекций:

- крупозная пневмония (лобарная пневмония)
- бронхопневмония (очаговая пневмония)
- ползучая язва роговицы
- гнойный отит
- менингит (основные возбудители менингитов у детей младшего возраста - *S. pneumoniae* и *H. influenzae*)

Клинические формы пневмококковых инфекций: (долевые поражения легких)



Иммунитет

- После пневмококковой инфекции формируется типоспецифический иммунитет, который в основном связан с антикапсулярными антителами - опсонинами.
- Иммунитет не постоянный и сохраняется до года.

Микробиологическая диагностика пневмококковых инфекций:

материалы исследования:

- кровь
- гной
- раневой материал
- ликвор
- мокрота
- мазок со слизистой носа и зева
- моча



Микробиологическая диагностика пневмококковых инфекций:

➤ бактериоскопический метод:

- обнаружение ланцетовидных диплококков

➤ бактериологический (культуральный) метод:

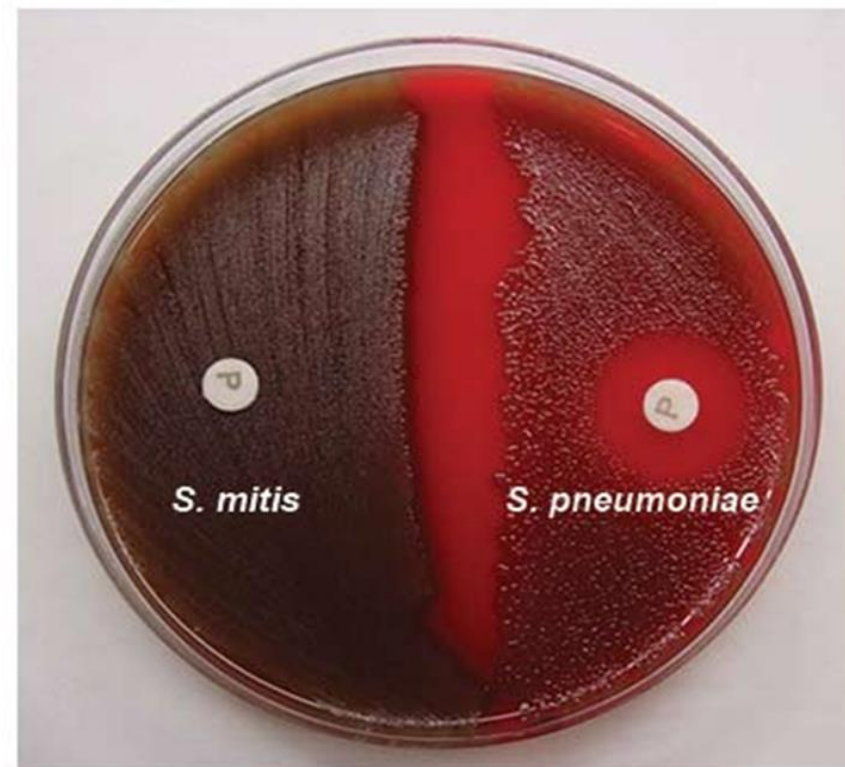
- инокуляция патологического материала на питательные среды
- инкубация при температуре 37°C на 18-24 часа
- получение чистой культуры , идентификация по морфологическим , культуральным , гемолитическим и биохимическим свойствам
- определение чувствительности к антибиотикам

➤ биологический метод:

- Внутривентриально заражают белых мышей

Отличительные признаки пневмококков от других стрептококков:

- Колонии пневмококков не сливаются между собой
- Образуют альфа-гемолиз
- Способность ферментировать инулин
- Лизируются под действием желчи и желчных кислот
- Чувствительность к оптохину



Тест на оптохин

S.mitis - устойчивый

S.pneumoniae - чувствительный

Лечение и профилактика

- **При лечении** применяют пенициллин, макролиды и тетрациклины. В последнее время все чаще используют ванкомицин, учитывая резистентные штаммы.
- **Специфическая профилактика** - предложена вакцина на основе капсульных полисахаридов еще 14 патогенетически важных серовариантов пневмококков.

Специфическая профилактика пневмококковых инфекций

В США доступны два типа пневмококковой вакцины:

- Пневмококковые конъюгированные вакцины (PCV13, PCV15 и PCV20)

Пневмококковая полисахаридная вакцина (PPSV23)

CDC рекомендует PCV13 для всех детей младше 2 лет и детей в возрасте от 2 до 18 лет с определенными медицинскими показаниями. Для тех, кто никогда не получал конъюгированную пневмококковую вакцину, CDC рекомендует PCV15 или PCV20 для взрослых в возрасте 65 лет и старше и взрослых в возрасте от 19 до 64 лет с определенными заболеваниями или факторами риска. Если используется PCV15, следует ввести дозу PPSV23. CDC также рекомендует PPSV23 для детей в возрасте от 2 до 18 лет с определенными заболеваниями.

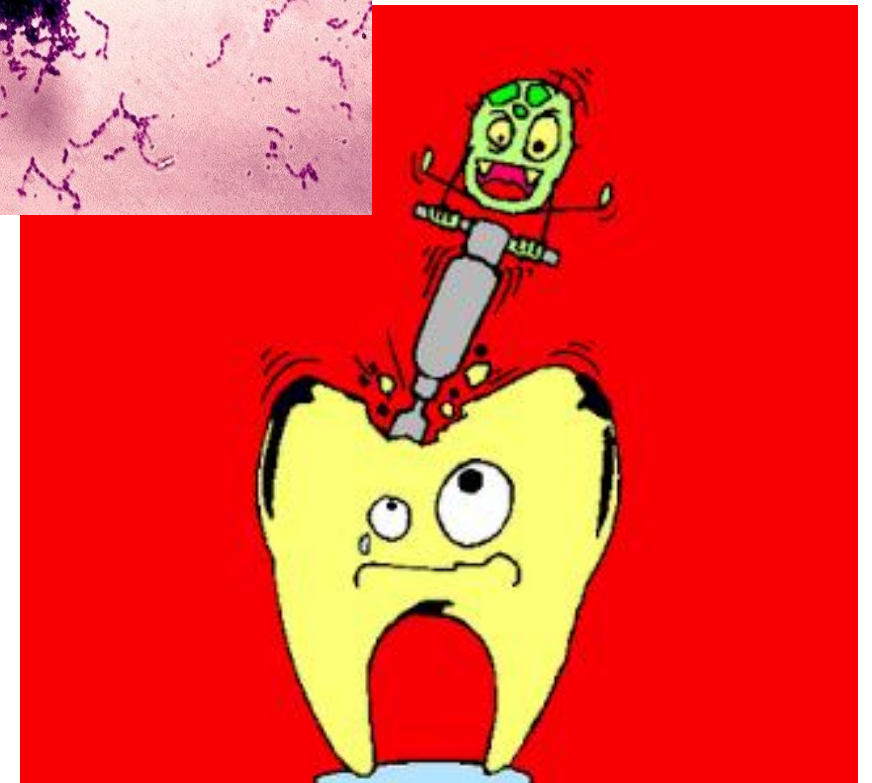
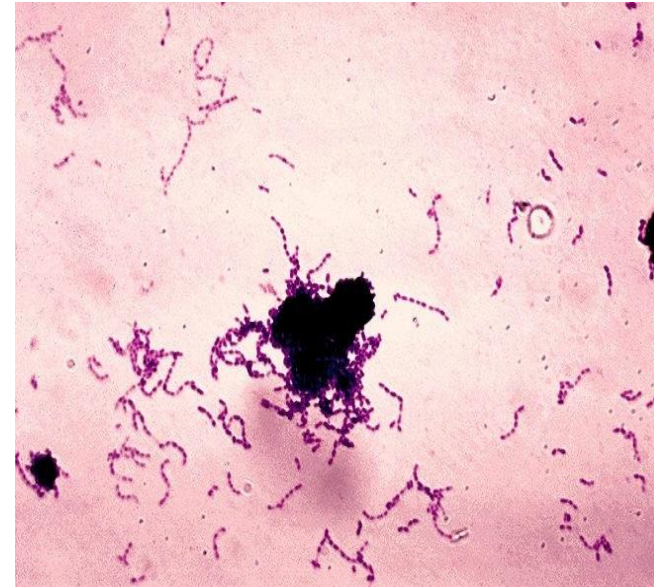
Группа Streptococcus viridans (культура на кровяном агаре)

S.mitis, S.mutans, S.salivaris, S.sanguis – альфа-гемолитические стрептококки группы *Streptococcus viridans* . Эти стрептококки относятся к нормальной микрофлоре человека, в основном являются представителями нормофлоры верхних дыхательных путей и слизистой оболочки ротовой полости.

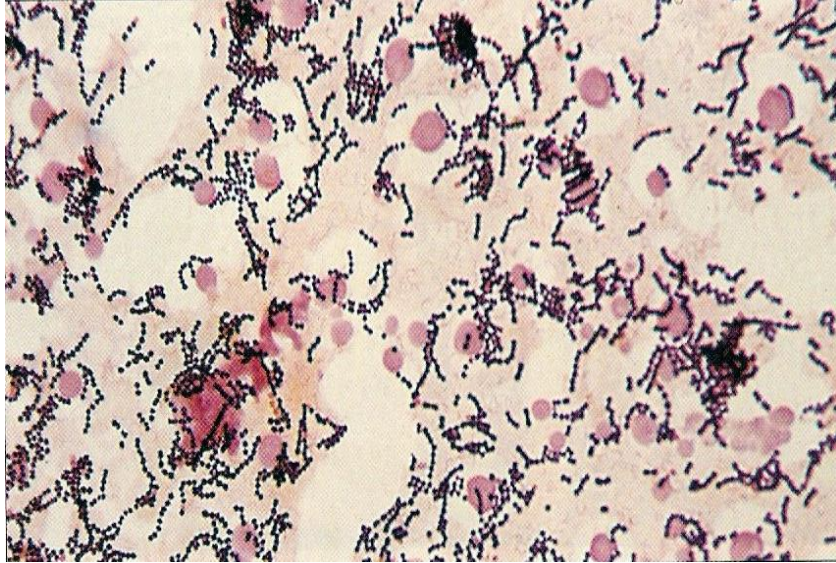


Streptococcus mutans

Кариес зубов вызывают стрептококки группы вириданс обитающие в ротовой полости. На поверхности зубной эмали образуются налеты (бляшки), состоящие из желатинообразного осадка высокомолекулярных углеводов - глюканов, на которых адгезируются кислотообразующие бактерии. Глюканы в основном, синтезируются *S.mutans*. Расщепление углеводов, входящих в состав бляшек стрептококками и лактобактериями приводит к выделению кислоты ($pH < 5$). Высокие концентрации кислоты способствуют деминерализации зубной эмали и развитию кариеса.



Стрептококки группы В - *Streptococcus agalactiae*



Возбудитель неонатального сепсиса и менингита.

Основные параметры идентификации :

Грамположительные , неподвижные кокки. Спор и капсул не образуют. Хорошо растут на кровяном и шоколадном агаре, слабо - на простых питательных средах . На жидких средах образуют осадок. Обладают слабой бета-гемолитической активностью.



Основной параметр идентификации - **CAMP-** (Christie, Atkins, Munch-Peterson) тест, основанный на феномене усиления гемолитического действия *S.aureus* в присутствии гемолизинов других бактерий .

Другие стрептококки

- *Streptococcus bovis* относится к группе D. Как представитель кишечной микрофлоры редко вызывает эндокардит, а в ряде случаев - бактериемию у больных раком кишечника. Он не вызывает гемолиза, а PYR-тест (тест гидролиза L-пирролидонил-2-нафтиламида) является отрицательным. Растет в желчной среде и гидролизует эскулин, но не растет в присутствии 6,5% NaCl.

Enterococcus faecalis

Грамположительные диплококки сферической или овальной формы размером 2мкм, располагающиеся парами или короткими цепочками. Спор и капсул не образуют. Некоторые виды обладают подвижностью. Могут расти на простых питательных средах, на кровяном агаре образуют неполный гемолиз. В отличие от зеленеющих стрептококков энтерококки могут расти при повышенной концентрации соли (6.5% NaCl).

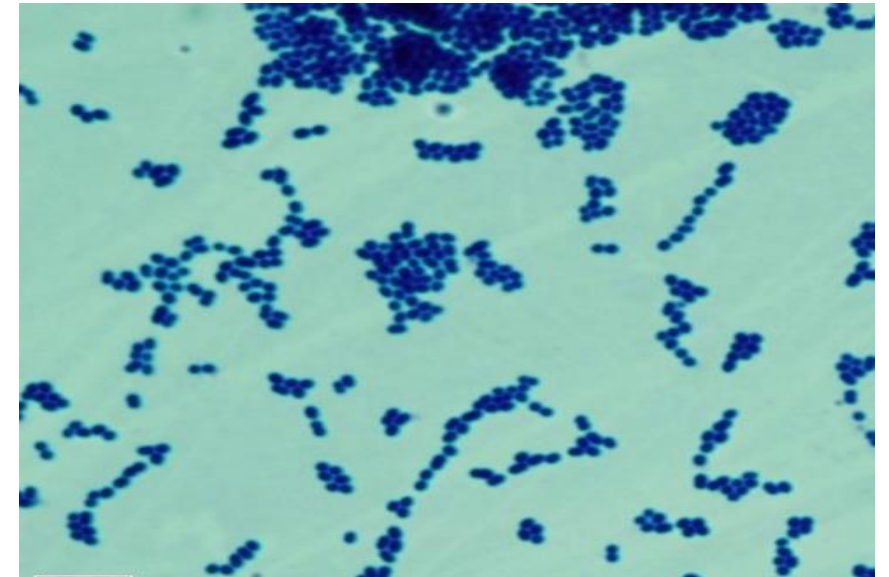
Факторы патогенности — компоненты клеточной стенки, ферменты агрессии и токсины.

Условно-патогенные бактерии, вызывают оппортунистические инфекции.

Основные дифференциальные признаки — рост на среде с добавлением желчных солей и расщепление эскулина.



E. faecalis
(Культура на кровяном агаре)



E. faecalis
(в мазке)

Резистентность энтерококков к антибиотикам (vancomycin-resistant enterococcus (VRE))

- Ванкомицин и тейкопланин связываются с частью D-аланин-D-аланин на конце молекулы NAM-пентапептида в цитоплазматической мембране, тем самым ингибируя участие NAM в синтезе клеточной стенки.
- Некоторые штаммы энтерококков заменяют последний D-аланин в NAM-пентапептиде на D-лактат, и проявляют устойчивость к гликопептидным антибиотикам.