

Занятие 9

Введение в частную микробиологию.

**Микробиологическая диагностика
заболеваний, вызванных
грамположительными кокками (роды
Staphylococcus, Streptococcus и *Enterococcus*)**

➤ ***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)

- **протозология** (наука о простейших)

Грамположительные кокки как возбудители гнойно-воспалительных заболеваний:

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

Стафилококки :

Классификация :

Семейство : *Micrococcaceae*

Род : *Staphylococcus*

Вид : *S.aureus*, *S.epidermidis*,

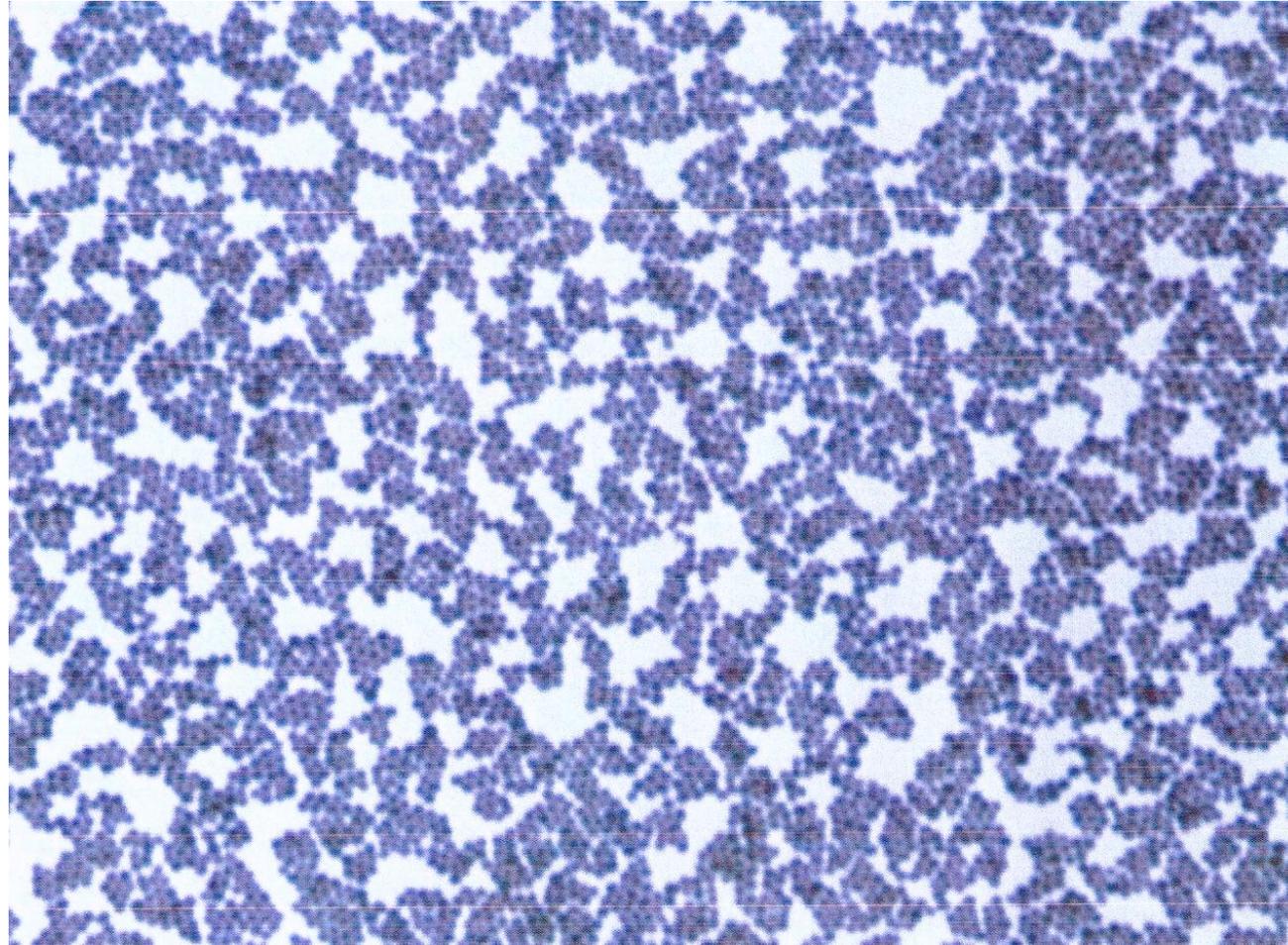
S.saprophyticus

Морфо-биологические 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)



Морфо-биологические свойства :

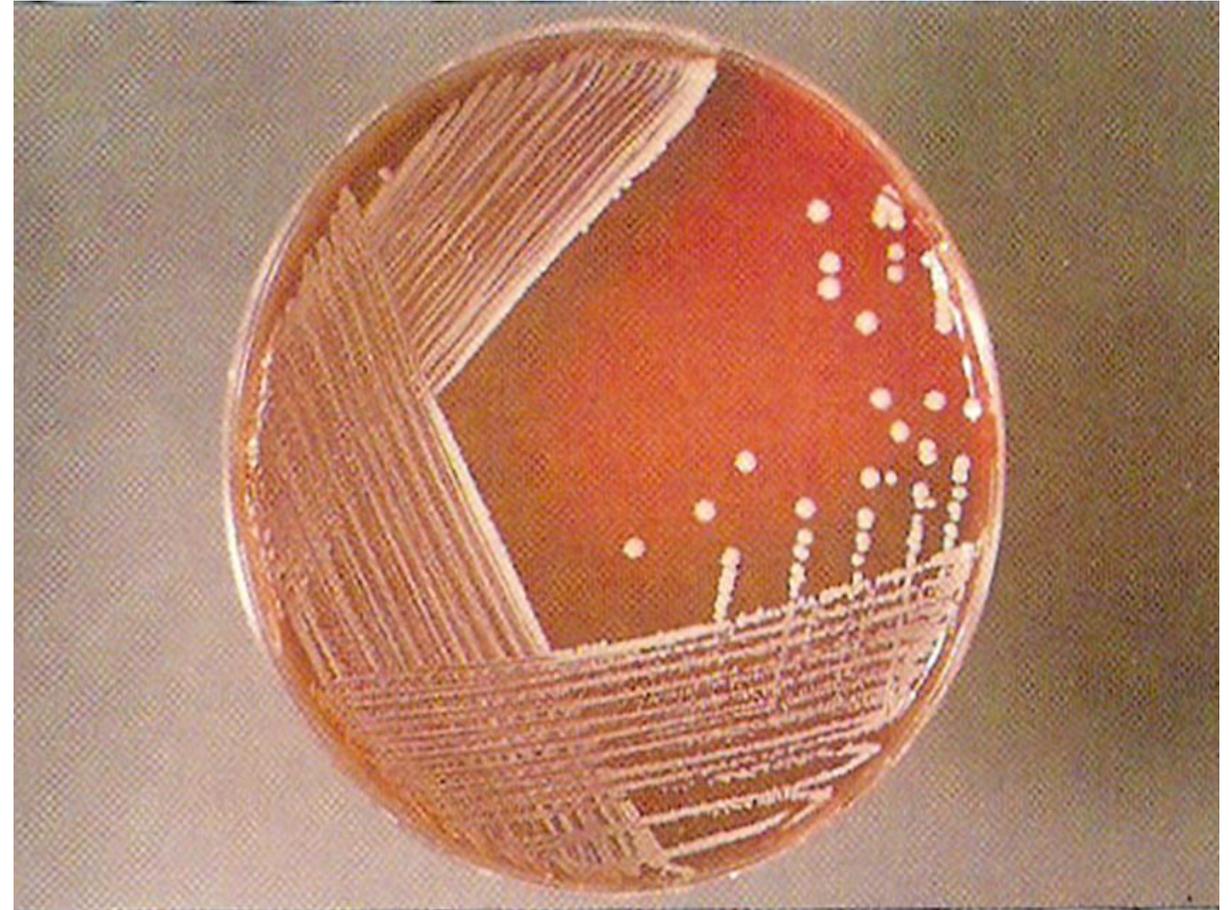
На плотных питательных средах - образуют круглые , гладкие, выпуклые , блестящие колонии ; *Staphylococcus aureus* вырабатывает золотистый пигмент, окрашивающий колонии в желтый цвет.

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

Культуральные свойства:
(на кровяном агаре вызывают гемолиз)



Staphylococcus aureus
(гемолитические колонии, зоны бета-гемолиза)

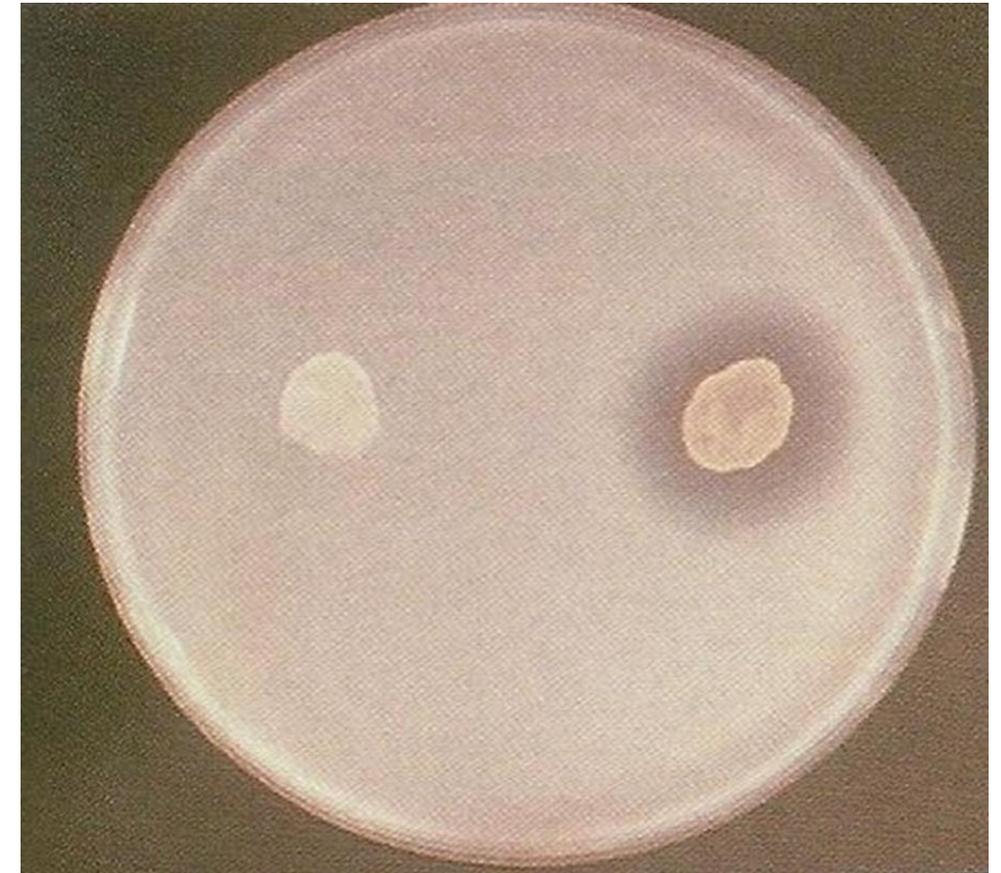
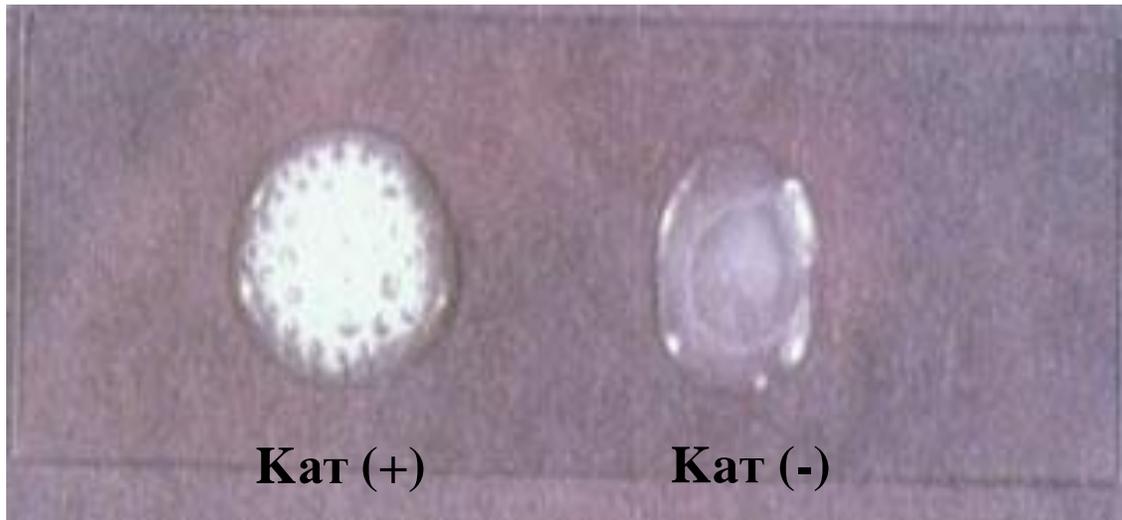


Staphylococcus epidermidis
(негемолитические колонии)

Биохимические свойства стафилококков
(внутривидовые дифференциальные признаки)

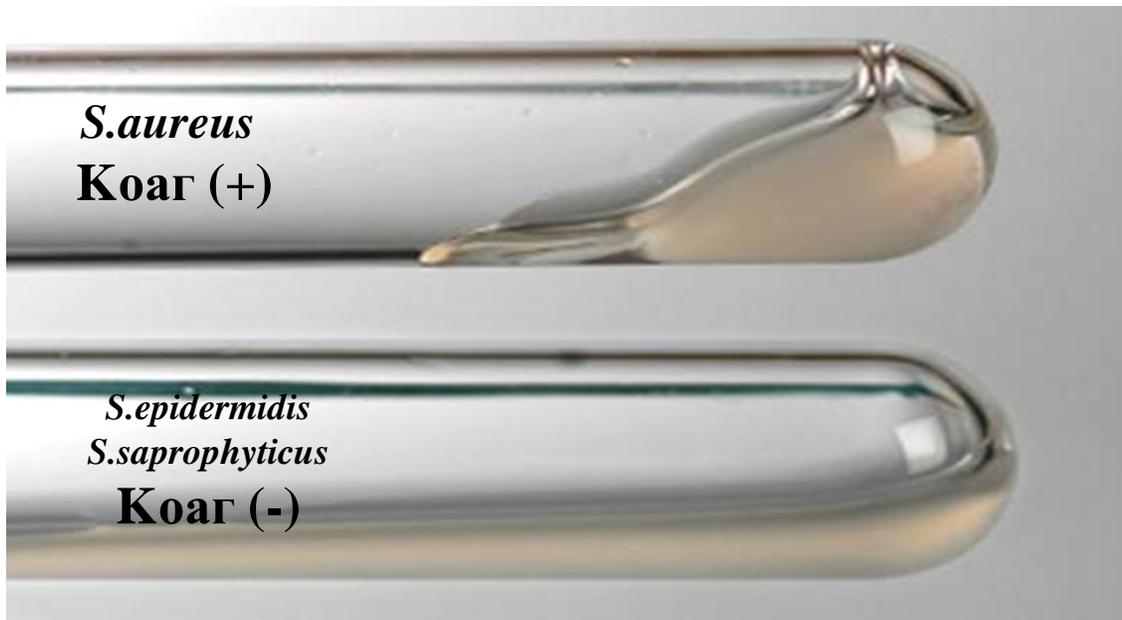
<i>Признак</i>	<i>S.aureus</i>	<i>S.epidermidis</i>	<i>S.saprophyticus</i>
β-гемолитическая активность	+	-	-
Восстановление нитратов	+	+	-
Ферментация маннита в анаэробных условиях	+	-	-
Ферментация маннита в аэробных условиях	+	-	+
Коагулаза	+	-	-
Гиалуронидаза	+	±	-
Фибринолизин	±	±	-
Щелочная фосфатаза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

***Род Staphylococcus* (биохимические свойства)**



ДНКаза (-)
S. epidermidis

ДНКаза (+)
S. aureus



Staphylococcus aureus

(определение лецитиназной активности на желточно-солевом агаре)

лецитиназа *S. aureus* вызывает образование радужного венчика (непрозрачная зона) вокруг колоний на питательной среде



Под Staphylococcus

Антигенные свойства

микрокапсула -

пептидогликан -

тейхоевая кислота - обладает видоспецифичностью:

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

Факторы патогенности *Staphylococcus aureus*

➤ **клеточные компоненты :**

микрокапсула

компоненты клеточной стенки

➤ **ферменты :**

лецитиназа

коагулаза

фибринолизин

гиалуронидаза

каталаза

бета-лактамаза

➤ **токсины :**

*гемолизин (alfa-,beta-,delta-
gamma-)*

лейкоцидин

эксфолиатины

*токсин синдрома токсического
шока (TSST-1)*

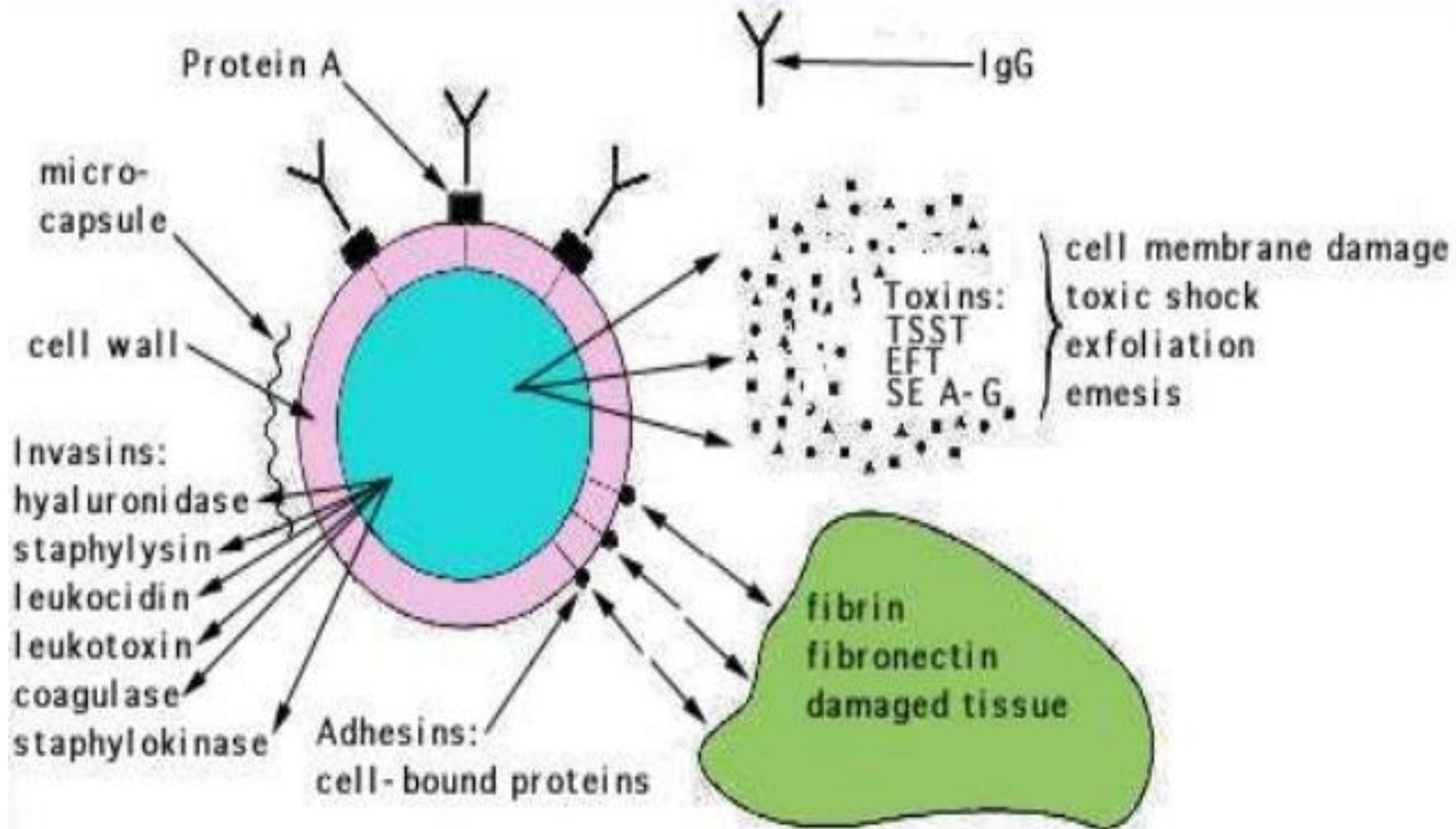
энтеротоксины

**Особенности развития
резистентности *Staphylococcus
aureus* к лекарственным
препаратам
(*MRSA*- штаммы)**

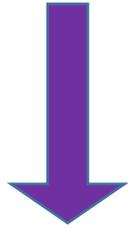
- **В результате генных мутаций у бактерий синтезируется белок, не способный связываться с *бета-лактамными* антибиотиками, что обуславливает развитие резистентности ко всем *бета-лактамным* антибиотикам**



Факторы патогенности *Staphylococcus aureus*



Инфекции, вызванные стафилококками:



Болезни кожи

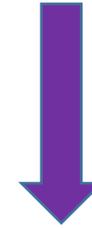
пиодермии
фурункул
карбункул
фолликулит
сикозы
ячмень(инфекции век)
импетиго
пемфигус
панариций
гидраденит
раневые инфекции
Болезнь Риттера



Гнойно-воспалительные процессы

абсцессы
флебит
остеомиелит
менингит
эндокардит
стоматит
энтерит
перитонит
конъюнктивит
уретрит
отит

артрит
пневмония
ангина
сепсис
плеврит
пиелит
цистит
мастит
эндокардит



Пищевые отравления

вызывают
стафилококки,
выделяющие
энтеротоксины



Синдром токсического шока

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

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



микробиологическая диагностика стафилококковых инфекций:



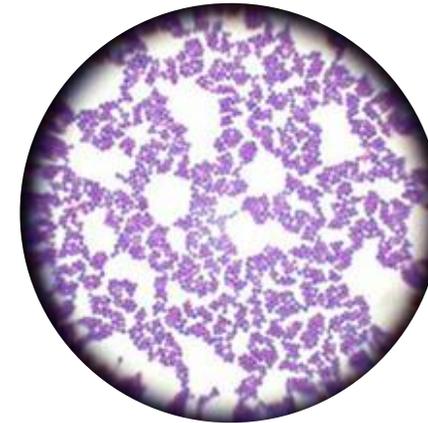
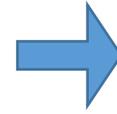
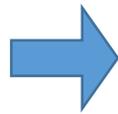
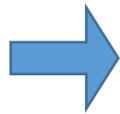
➤ *Микроскопический*

- 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

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.



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, Е, 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* .

Таксономия:

Семейство: *Streptococcaceae*

Род: *Streptococcus*

Вид: *Str.pyogenes*, *Str.pneumoniae*,
Str.viridans, *Str.agalactiae*

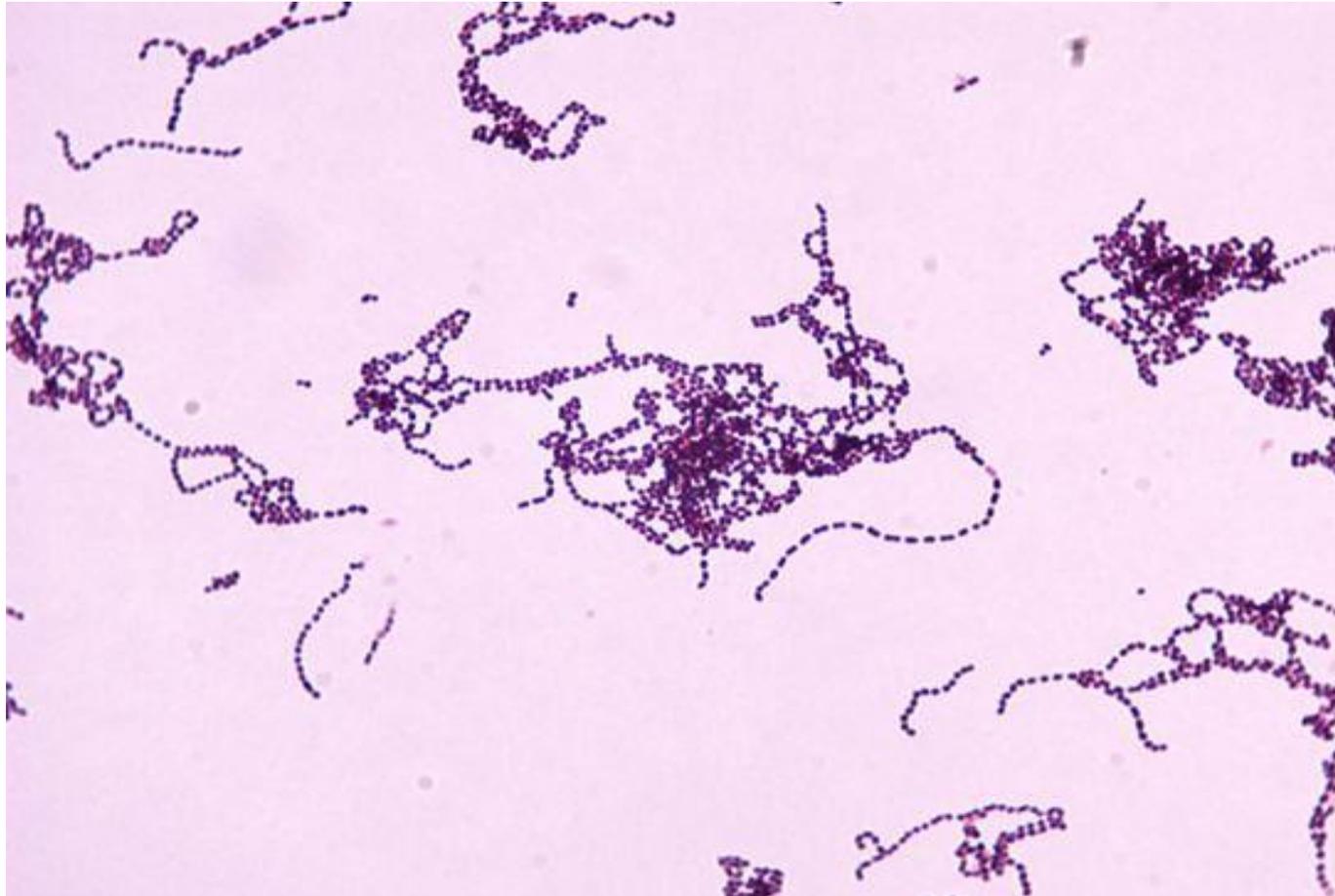
Морфо-биологические свойства:

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

(в мазке из чистой культуры, окраска по Граму)



Streptococcus pyogenes – культуральные свойства:

S. pyogenes – требовательны к питательным средам

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

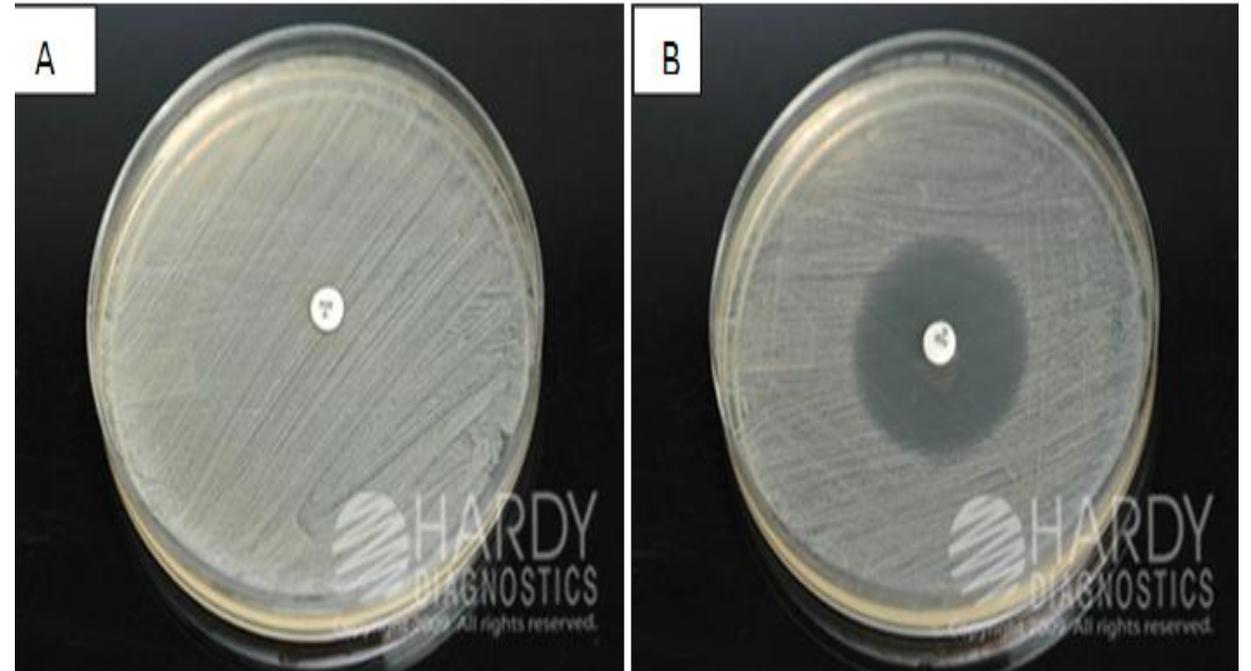
При росте на плотных питательных средах образуют мелкие, плоские, сероватые, мутные колонии диаметром около 1 мм (S-колонии). На жидких средах дают помутнение и небольшой хлопьевидный осадок.

На кровяном агаре вызывают *бета-гемолиз*.



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 :

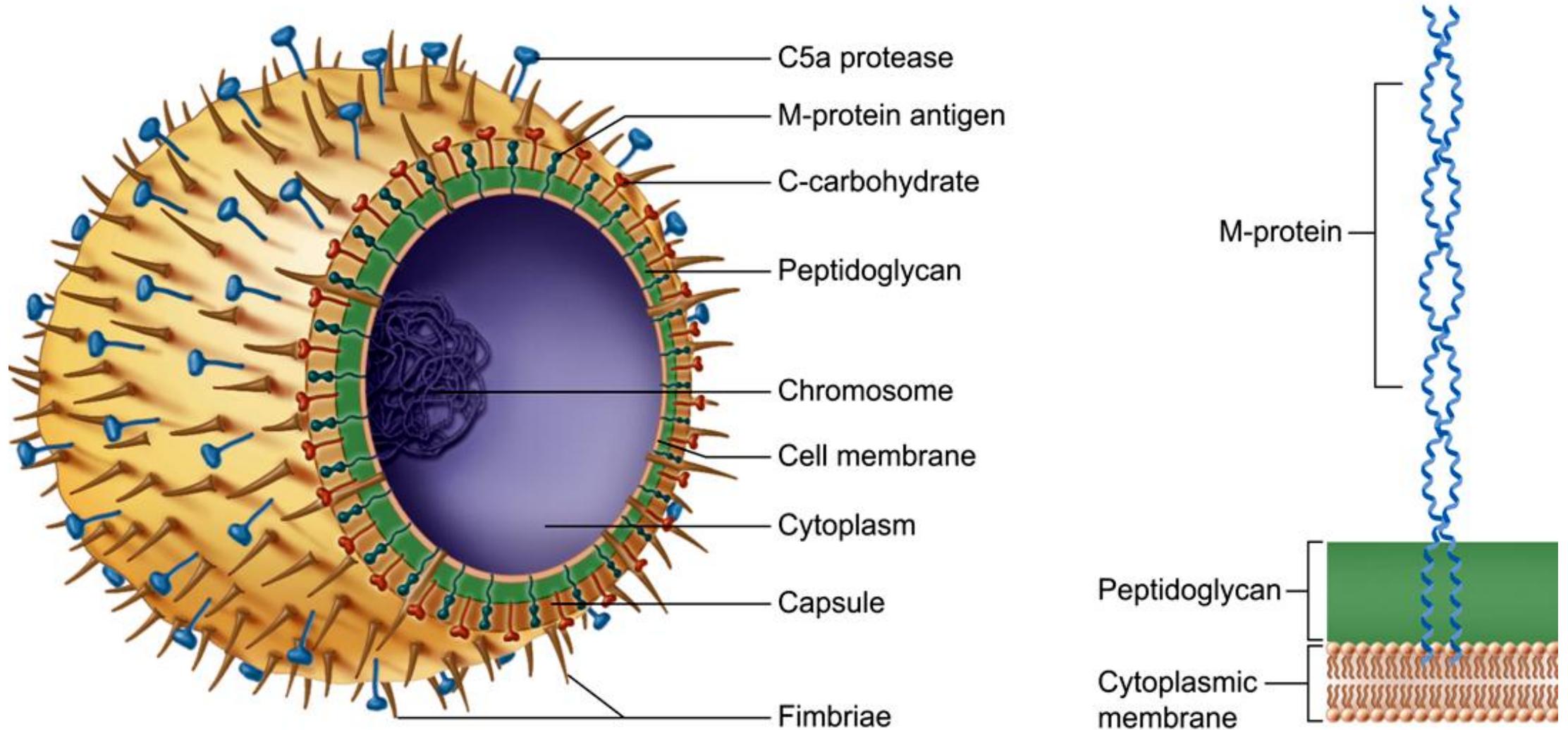
Стрептолизин-O - белок, проявляет иммуногенные свойства, чувствителен к кислороду, вызывает гемолиз в глубине кровяного агара, имеет диагностическое значение (антистрептолизин-O - ASO)

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 M-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:*

*Рожжа
«erysipelas»*



Импетиго



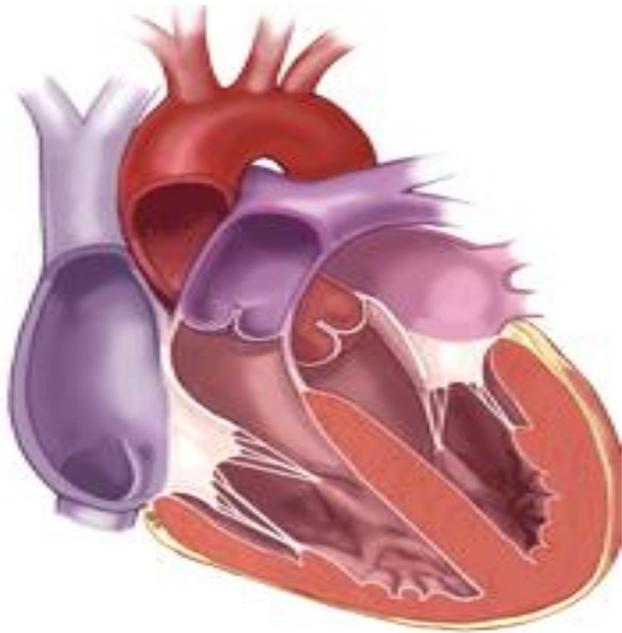
Негнойные инфекции :

Скарлатина

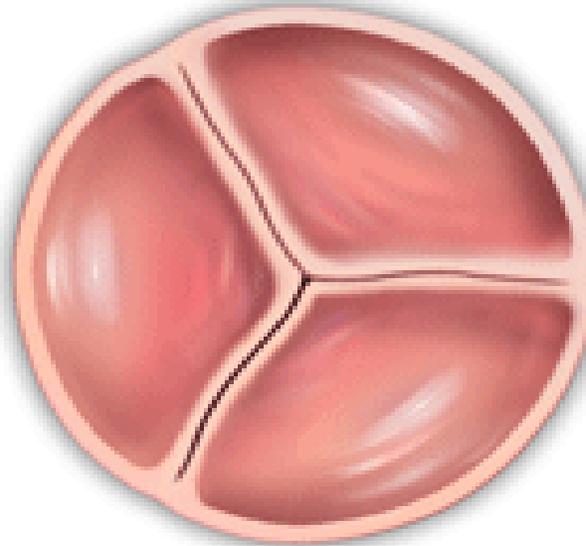


Негнойные инфекции стрептококковой этиологии:

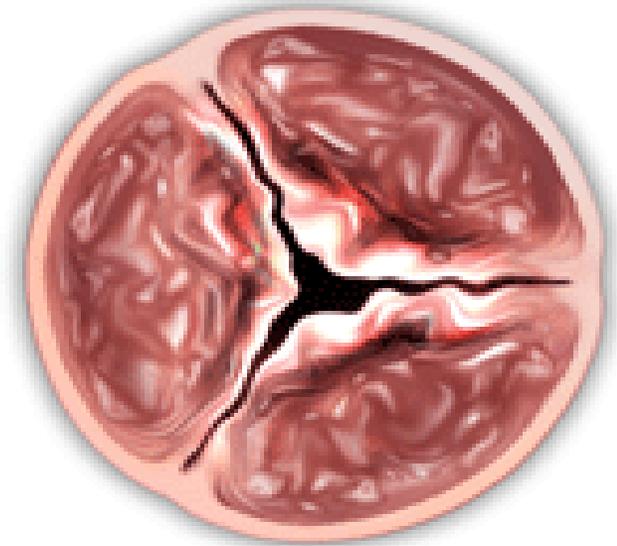
поражение клапанов сердца бета-гемолитическими стрептококками серогруппы А (S.pyogenes) при ревматизме



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:

Гнойно-воспалительные инфекции

Бактериологический (культуральный) метод

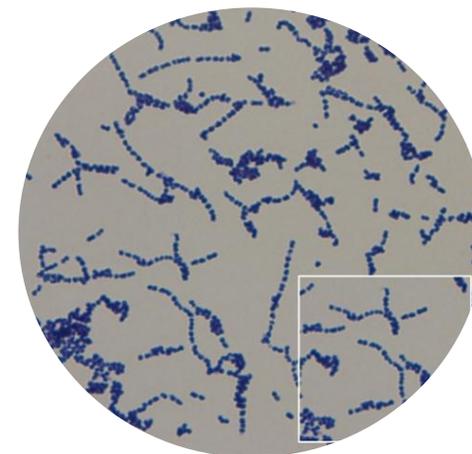
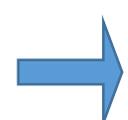
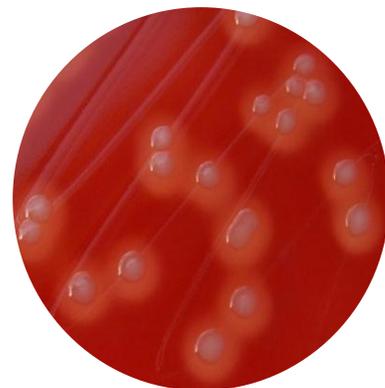
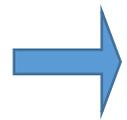
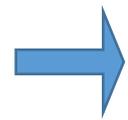
- посев исследуемого материала на специальные питательные среды
- инкубация при температуре 37°C на 18-24 часа
- Выделение чистой культуры и идентификация по морфологическим, культуральным, гемолитическим и биохимическим свойствам
- *Реакция Ленсфилд (реакция преципитации в жидкой среде для определения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

Негнойные инфекции

Серологический метод

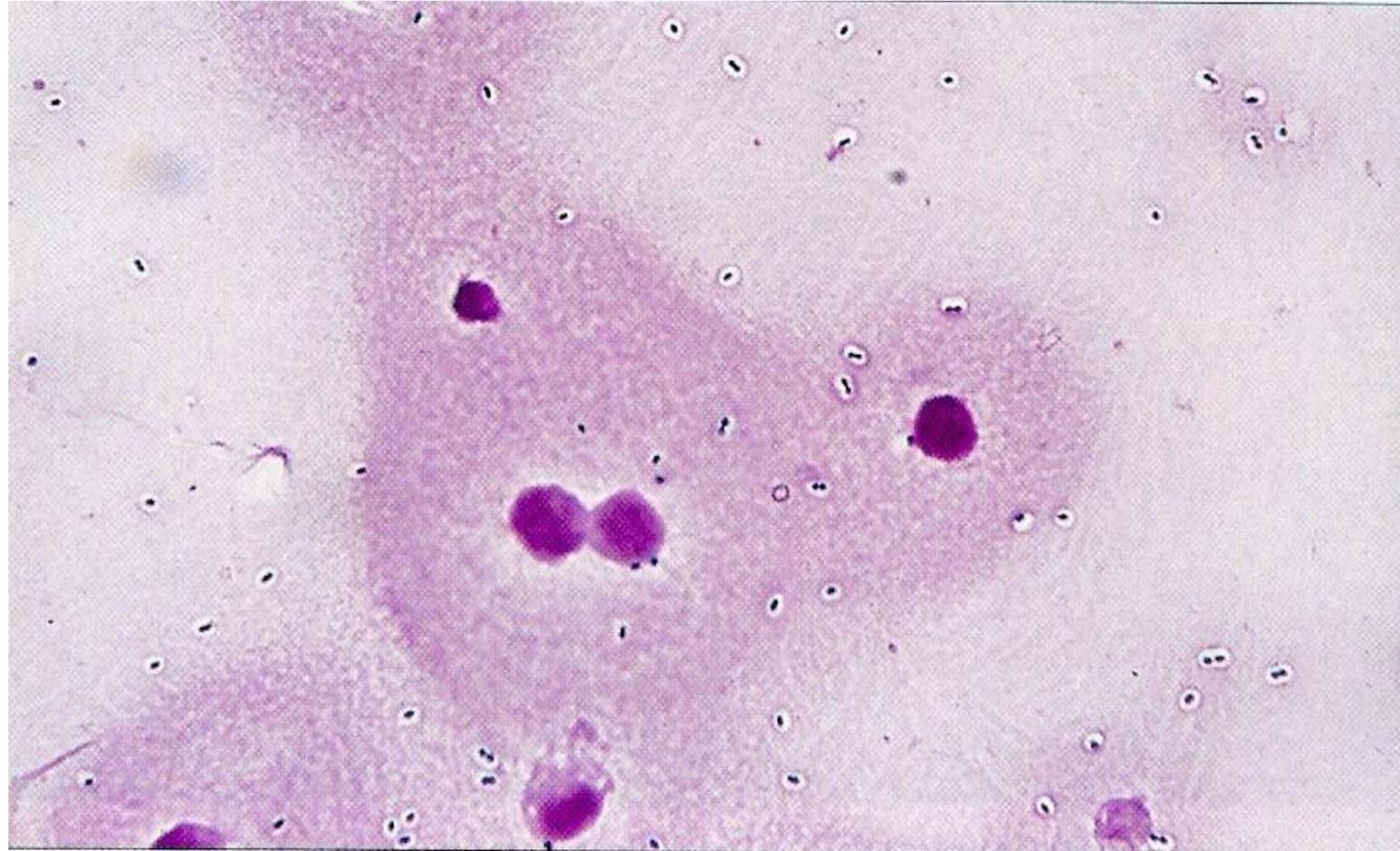
- *РСК* (реакция связывания комплемента – определение антител в сыворотке к стрептококковым антигенам)
- *Реакция нейтрализации* -(определение стрептококковых антител к токсинам- стрептолизину О или стрептодорназе)

Бактериологический метод исследования:



Streptococcus pneumoniae

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



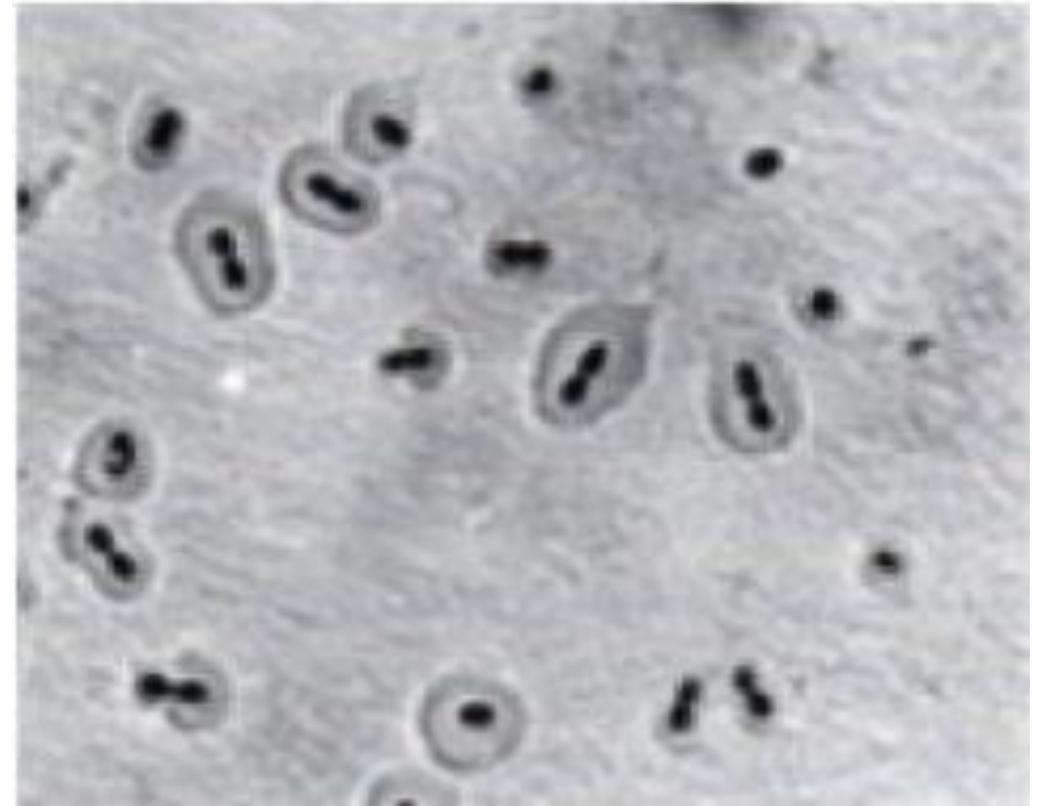
Streptococcus pneumoniae – культуральные свойства:

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.



Streptococcus pneumoniae

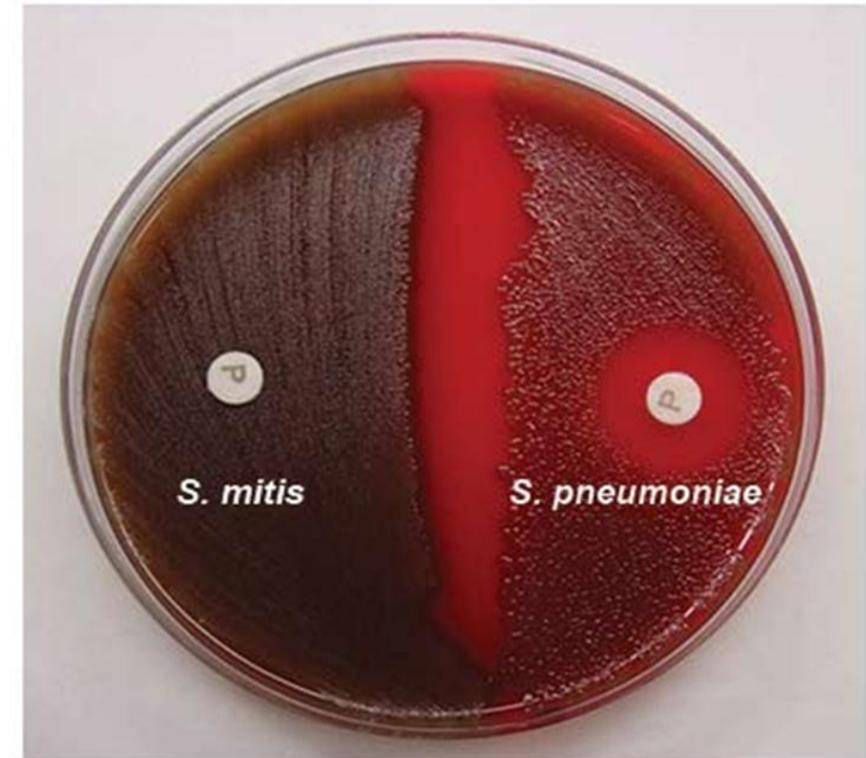
Реакция «*Quelling*» - реакция выявления капсул пневмококков, основанная на их набухании в присутствии специфических агглютинирующих АТ.



реакция «Quellung»

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

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

Streptococcus pneumoniae

(факторы патогенности)

➤ *Компоненты клетки :*

капсула
клеточная стенка (С-субстанция)

➤ *Ферменты агрессии :*

гиалуронидаза
нейраминидаза

➤ *Токсины :*

гемолизин
лейкоцидин

Эпидемиология пневмококковых инфекций :

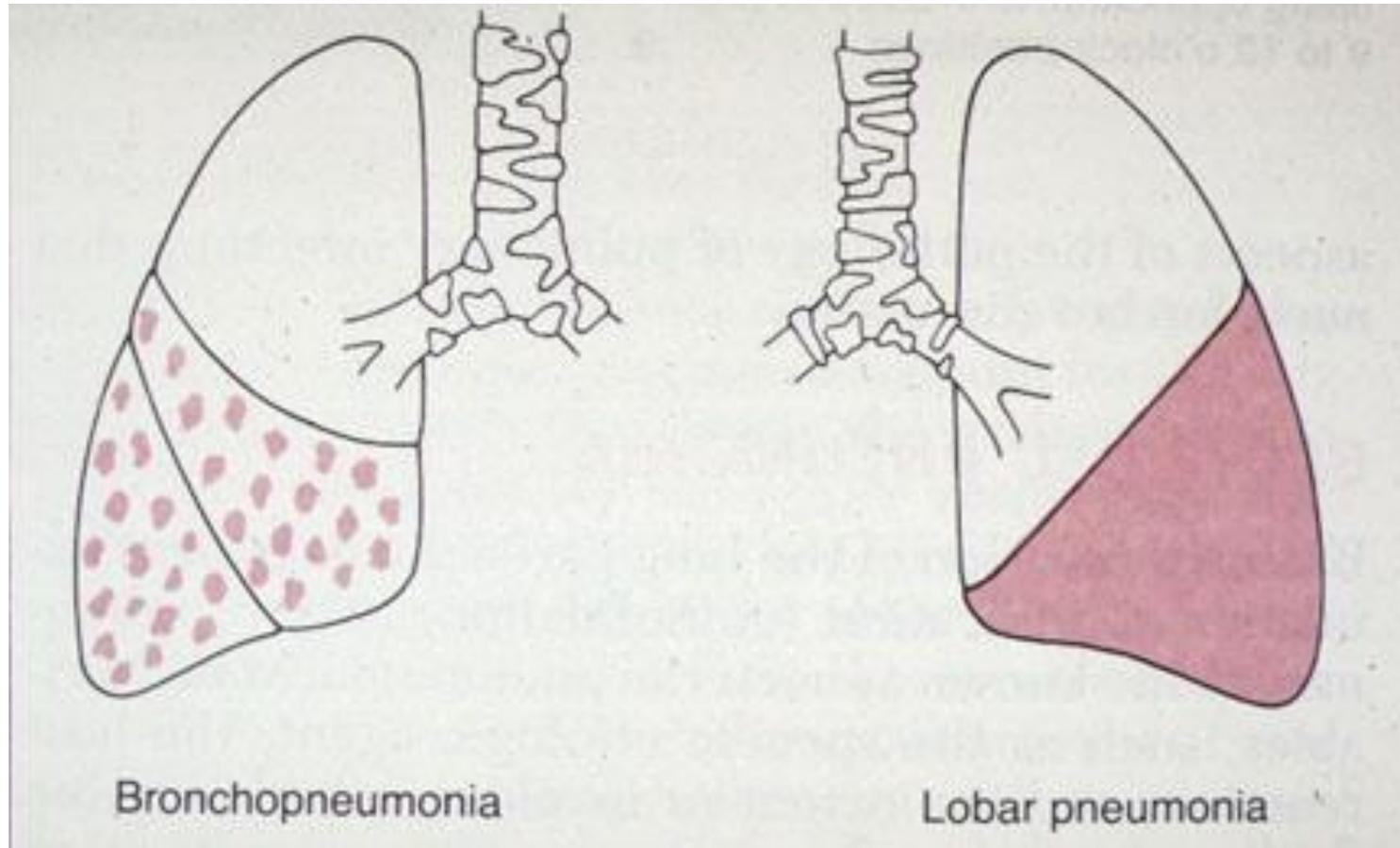
Источник инфекции: больные люди и бактерионосители

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)



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:

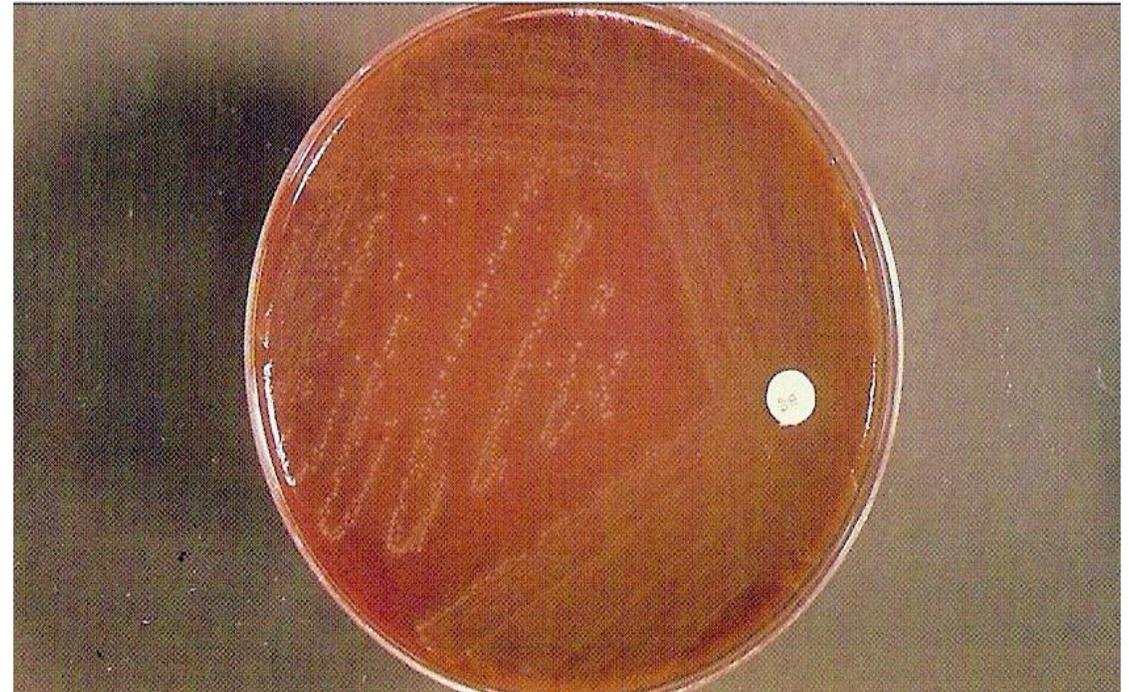
- инокуляция патологического материала на питательные среды
- инкубация при температуре 37°C на 18-24 часа
- получение чистой культуры , идентификация по морфологическим , культуральным , гемолитическим и биохимическим свойствам
- определение чувствительности к антибиотикам

➤ биологический метод:

- Внутрибрюшинно заражают белых мышей

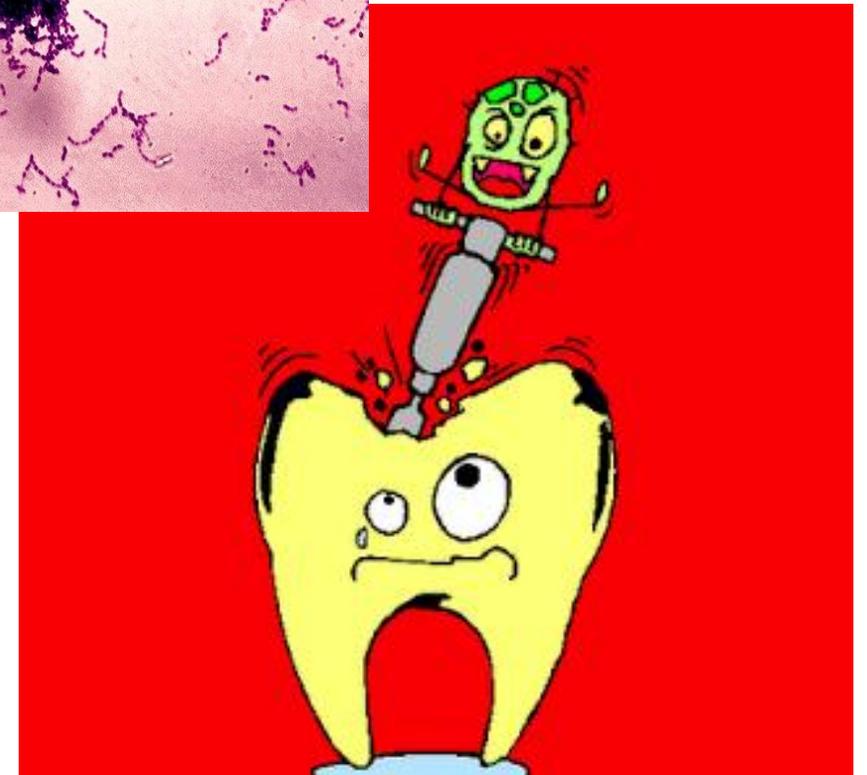
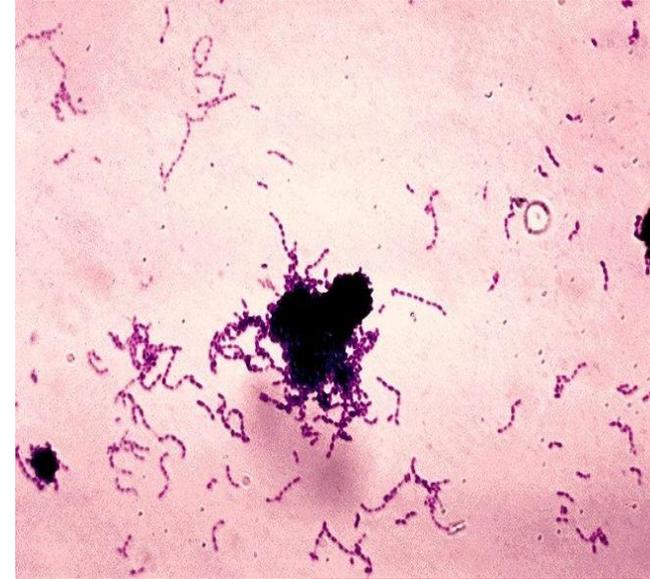
Группа Streptococcus viridans (культура на кровяном агаре)

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.

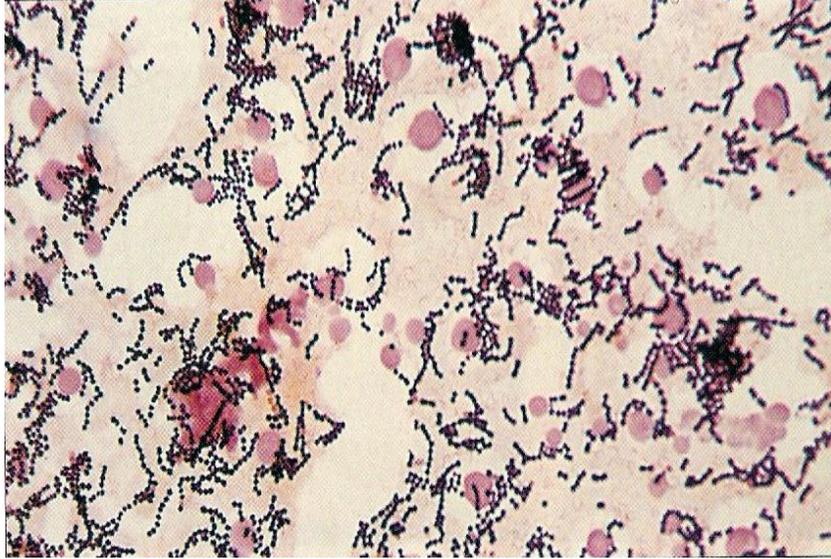


Streptococcus mutans

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 .

Enterococcus faecalis

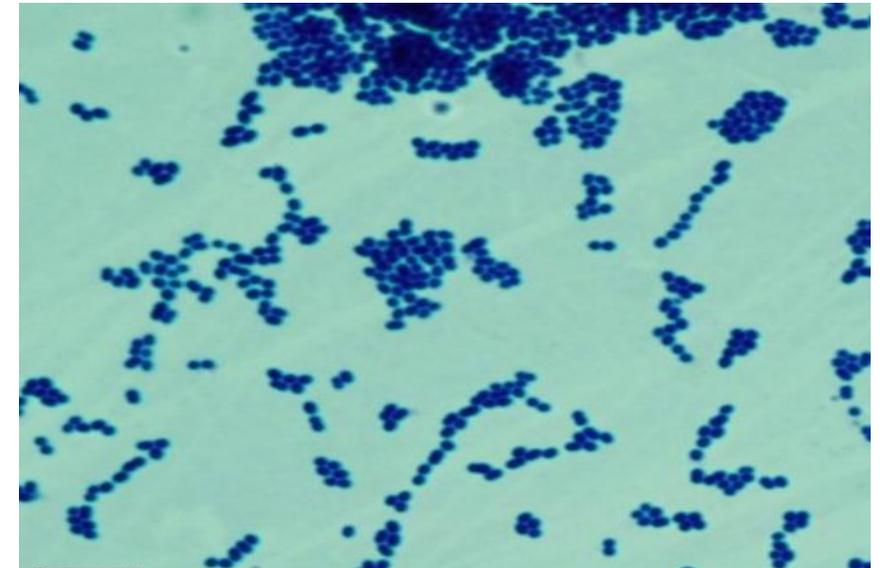
Грамположительные диплококки сферической или овальной формы размером 2мкм, располагающиеся парами или короткими цепочками. Спор и капсул не образуют. Некоторые виды обладают подвижностью. Могут расти на простых питательных средах, на кровяном агаре образуют неполный гемолиз. В отличие от зеленеющих стрептококков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

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)



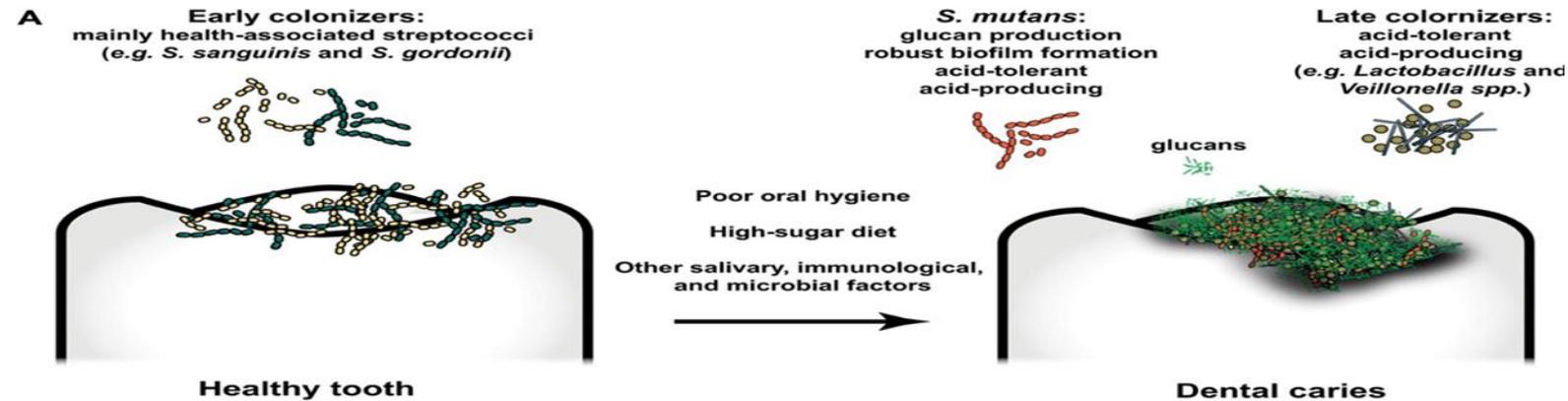
E. faecalis
(в мазке)

ФАКТОР ВИРУЛЕНТНОСТИ	БИОЛОГИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ
Агрегирующая субстанция	Облегчает обмен плазмидами и прикрепление к эпителию – фактор колонизации
Esp (<i>E. faecalis</i>) и Esp (<i>E. faecium</i>)-endocarditis and biofilm-associated pili	Формирование пилей, биопленки, развитие эндокардита
Углеводы адгезии	Фактор колонизации
Цитолизин	Бактериоцин ингибирует рост грам+ бактерий, индуцирует повреждение тканей
Феромон	Хемоаттрактант для нейтрофилов, регулирующий воспалительную реакцию
Желатиназа	Гидролизует желатин, коллаген, гемоглобин и др.
Устойчивость к антибиотикам	К аминогликозидам, β-лактамам,

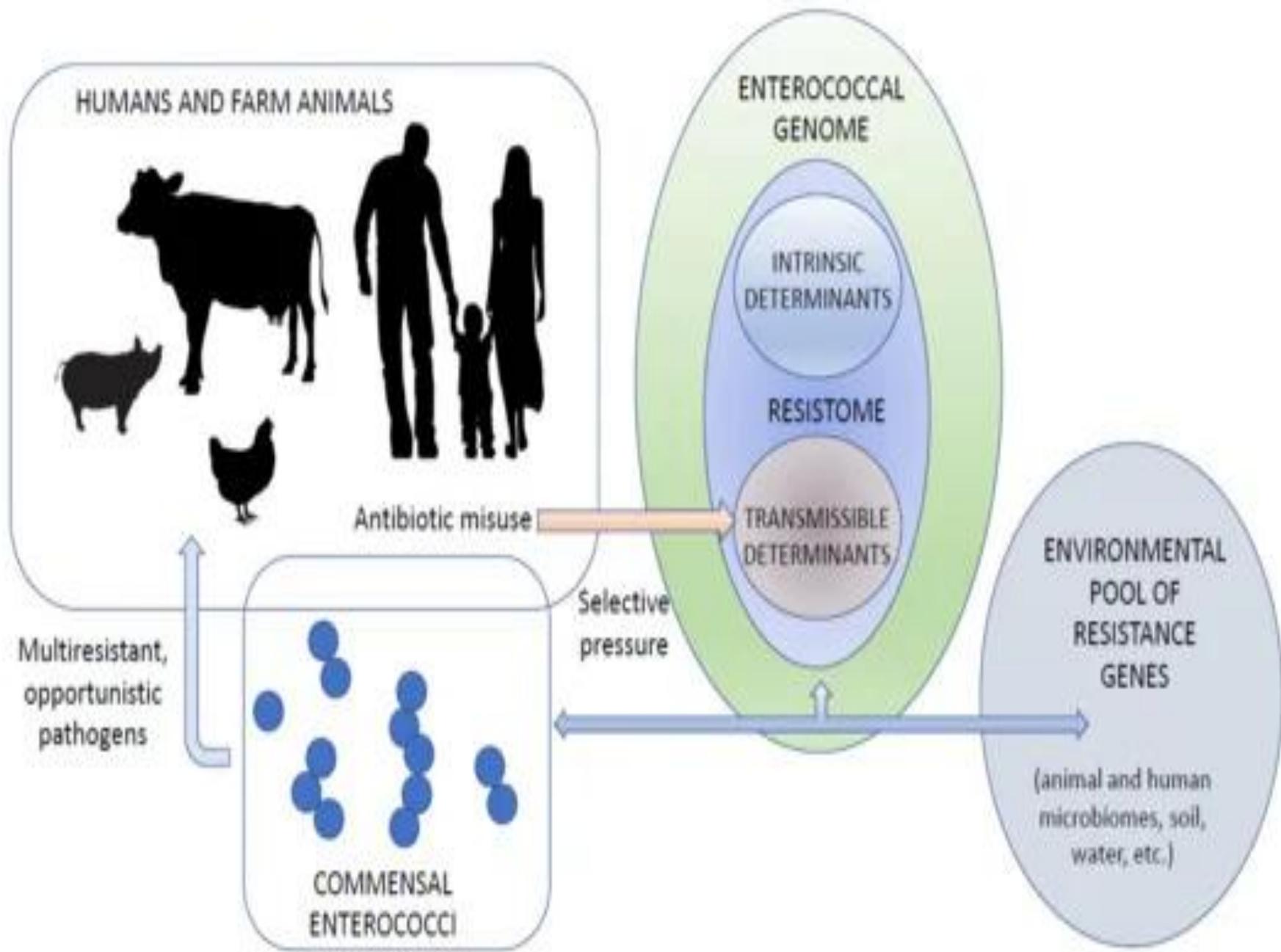
ЭПИДЕМИОЛОГИЯ, КЛИНИКА

- **Входят в состав флоры ЖКТ, и мочеполовой системы**
- **Не имеют органного тропизма как и все УПМ**
- **Вызывают бактериемии у иммунокомпромиссных лиц; поражения МПТ, после катетеризации; ВБИ после оперативных вмешательств; эндокардиты у пожилых и больных с клапанами сердца**

Частая патология, вызываемая зелеными стрептококками биогруппы *mutans* – кариозное поражение зубов.



Микроорганизмы содержат поверхностный белок, связывающий гликопротеины слюны, и (совместно с другими бактериями) образуют бактериальные бляшки на поверхности зубов. Бактерии разлагают сахарозу, поступающую с пищей, до молочной кислоты, вызывающей деминерализацию зубной эмали.



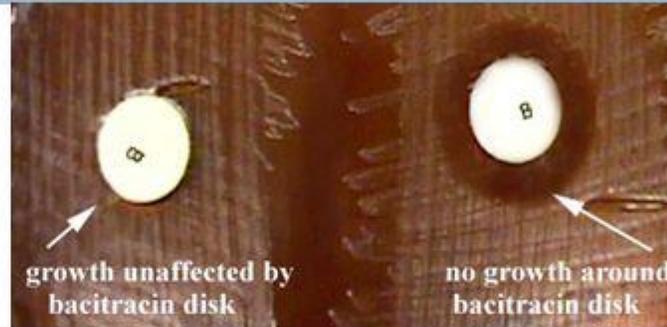
Диагностика энтерококковых инфекций проводится бактериологическим методом

- Рост на кровяном, желчно-эскулиновом и шоколадном агаре**
- При рН 9.6**
- Вызывают обесцвечивание метиленового синего при росте в молоке**
- Растут при повышенной концентрации NaCl**
- Резистентны к желчи**

Group D enterococci

(Biochemical identification)

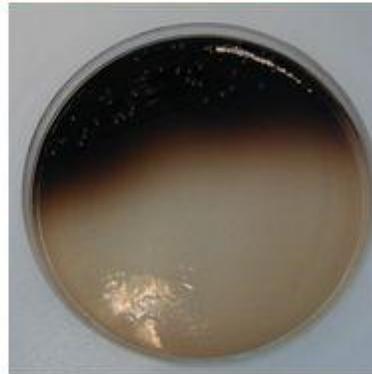
□ **Bacitracin-resistant**



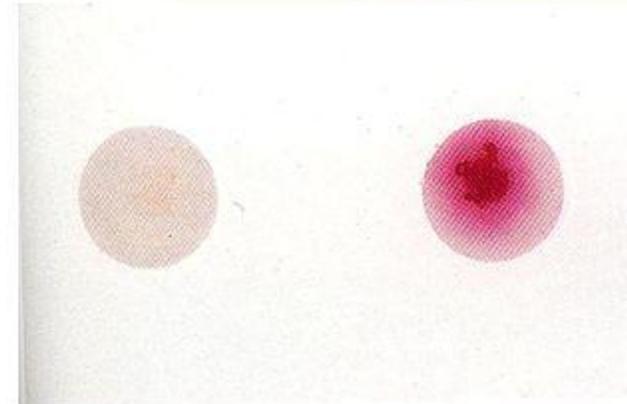
□ **CAMP factor (-)**



□ **Esculin hydrolysis(+)**



□ **PYR (+)**



Sulfometaxazole resistant

□ **6.5% salt resistant**

Профилактика стрептококковых инфекций

- **Неспецифическая – соблюдение санитарно-гигиенического режима, правил асептики, антисептики, дезинфекции и стерилизации в ЛУ.**
- **При пневмококковой инфекции – химическая вакцина состоящая из 7 капсульных антигенов для детей и 23 антигенов для взрослых.**