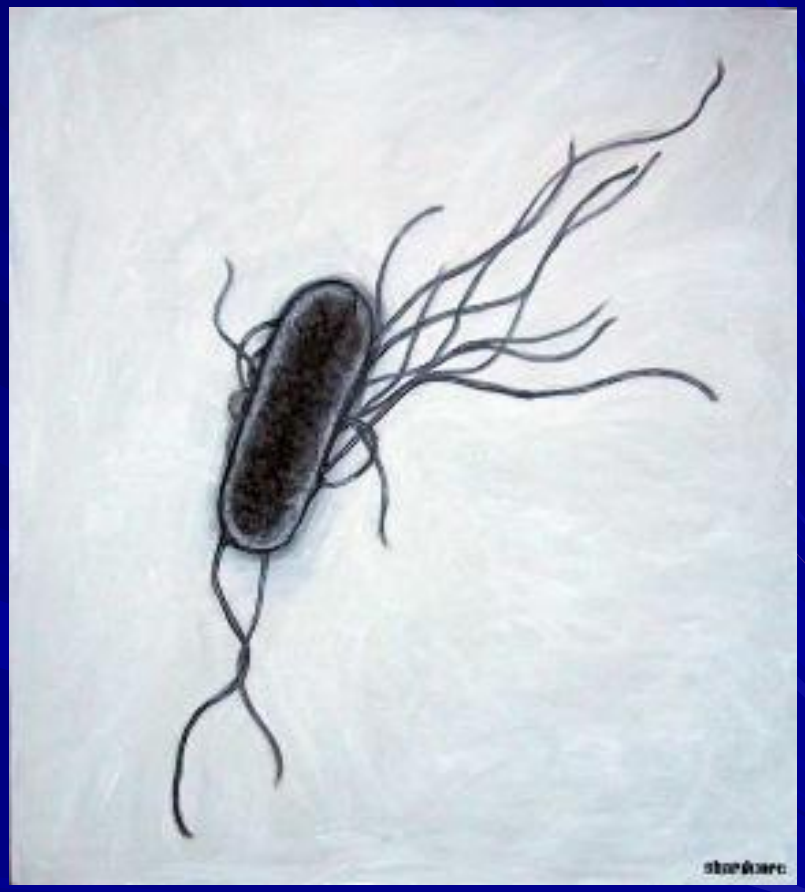
Энтеробактерии. Эшерихии, шигеллы, сальмонеллы



Зав. кафедрой
д.м.н., профессор
Г.И.Чубенко

Общая характеристика энтеробактерий

Семейства энтеробактерий:

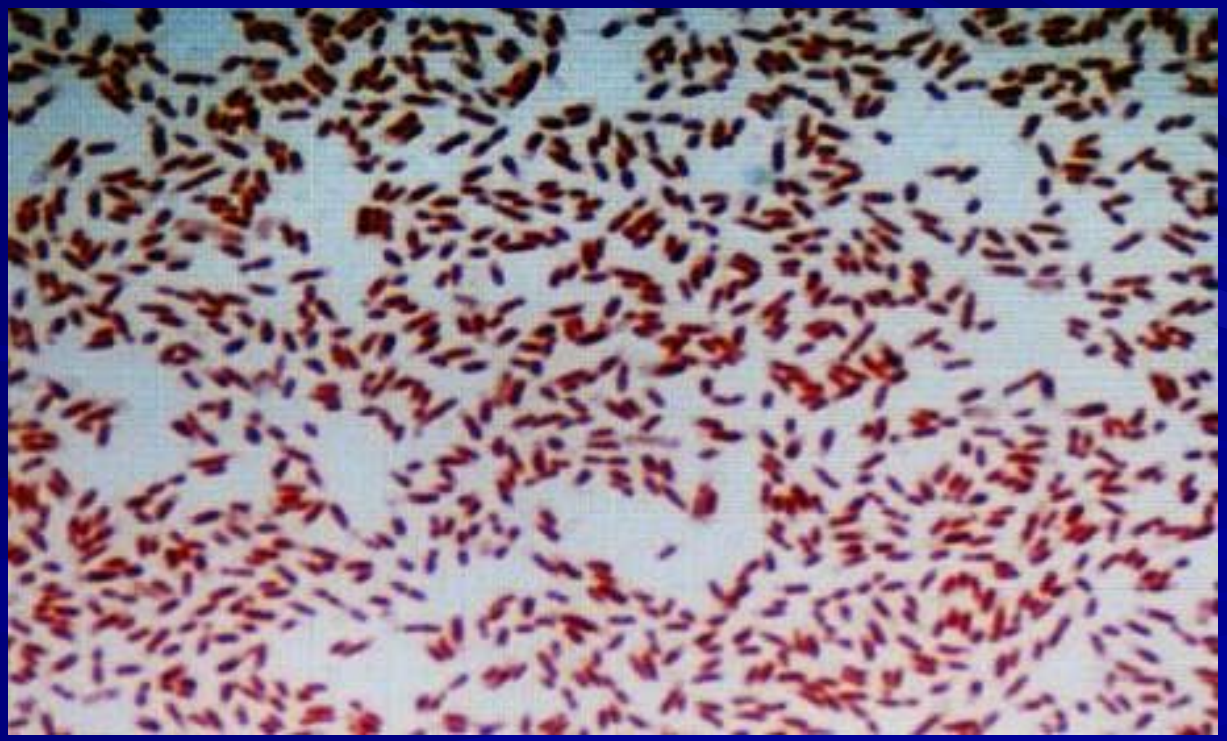
- небольшие, грамотрицательные, неспороносные палочки, подвижные или неподвижные, способны образовывать капсулу.

-Обладают свойством полиморфизма.

- Факультативные анаэробы, хемоорганотрофы, обладают дыхательным и бродильным типами метаболизма

-Хорошо растут на простых питательных средах, при температуре +37 ºС.

- Метаболически активны. Быстро ферментируют глюкозу с образованием кислоты или кислоты и газа.
- Оксидазо-отрицательны, каталазо-положительны,
- Восстанавливают нитраты до нитритов.



Способны вызывать:

заболевания желудочно-кишечного тракта, инфекции мочевыводящих, дыхательных путей, оппортунистические инфекции, а также раневые, внутрибольничные, гнойно-воспалительные заболевания.

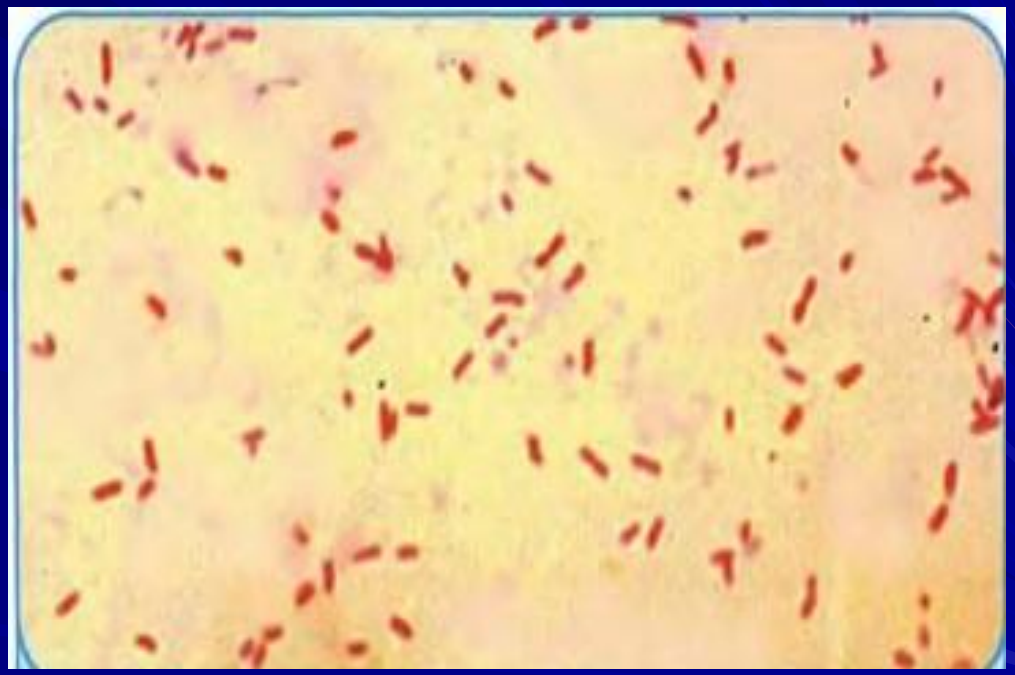
Группы бактерий	Роды представители семейства	Основные заболевания
Сальмонеллы	Salmonella typhi	Брюшной тиф
	Salmonella paratyphi A,B,C	паратиф
	Salmonella enteritidis и др.	сальмонеллез
Шигеллы	Shigella species	дизентерия
Иерсинии	Yersinia pestis	чума
	Yersinia enterocolitica	кишечный иерсиниоз
	Yersinia pseudotuberculesis	псевдотуберку лез
Условно-патогенные энтеробактерии	Escherichia, Proteus, Klebsiella, Citrobacter , Enterobacter, Hafnia, Erwinia, Providencia, Serratia и др.	Гнойно-воспалительн ые заболевания

Патогенные эшерихии

Род Escherichia

- E. coli

- E.blattae
- E.fergusonii
- E.hermanii
- E.vulneris

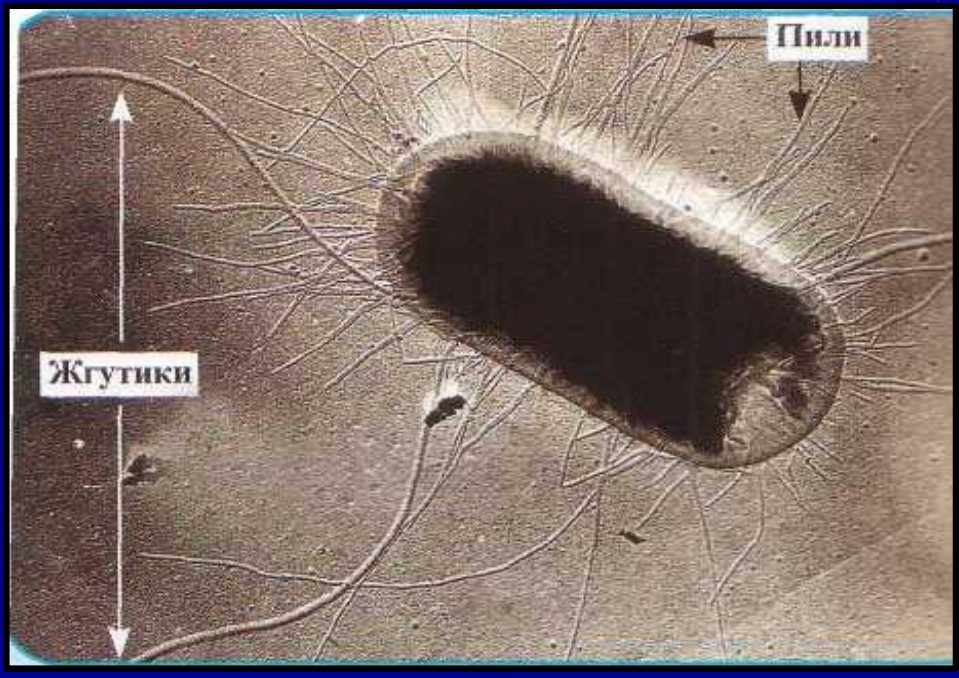


Морфология

прямые палочки размером

от 2 до 6 мкм.

В мазках располагаются одиночно или парами, в старых культурах могут выглядеть как коккобактерии. Имеют пили, могут быть как подвижны, так и неподвижны.



Антигенная структура

Кишечные палочки различают по структуре поверхностных АГ.

Выделяют:

- О- соматический (липополисахаридный),
- Н- жгутиковый,
- CFA- антиген колонизации

Ведущим является тестирование по О-АГ.

О-АГ

- Термостабилен;
- Липополисахарид;
- Более 173 разновидностей (О1, О2, …);

Факторный состав:

- ‘а’ - общий фактор;
- ‘в’, ‘с’… - дополнительные (О111 ав, О111ас, О128а, О128 ав, 128ас)

Н - антиген

- жгутиковый антиген, белковый;
- Термолабильный, 56 разновидностей (Н1, Н2…);

Свежевыделенные штаммы обычно слабо подвижны и обладают малым количеством Н-антигена.

CFA- антиген колонизации белковой природы, связан с фимбриями

Классификация патогенных КП

по Аг свойствам и клиническим проявлениям вызываемых ими заболеваний

Энтеропатогенные (ЭПКП)	**20**	**O55;O111; O119; O127; O128**
Энтеротоксигенные (ЭТКП)	**70**	**O6; O78; O153**
Энтероинвазивные (ЭИКП)	**8**	**O28; O112; O124; O136**
Энтерогеморрагические (ЭГКП)	**5**	**O157:H7;O26; O111;O145**
Энтероаггрегирующие (ЭАКП)	**7**	**O15; O44**
Диффузноадгезирующие	**2**	**O77, O86**

Культуральные свойства

Хорошо растут на простых питательных средах, pH 7,0-7,4.

На плотных средах образуют плоские, выпуклые колонии, чаще S-формы серо-белого цвета.

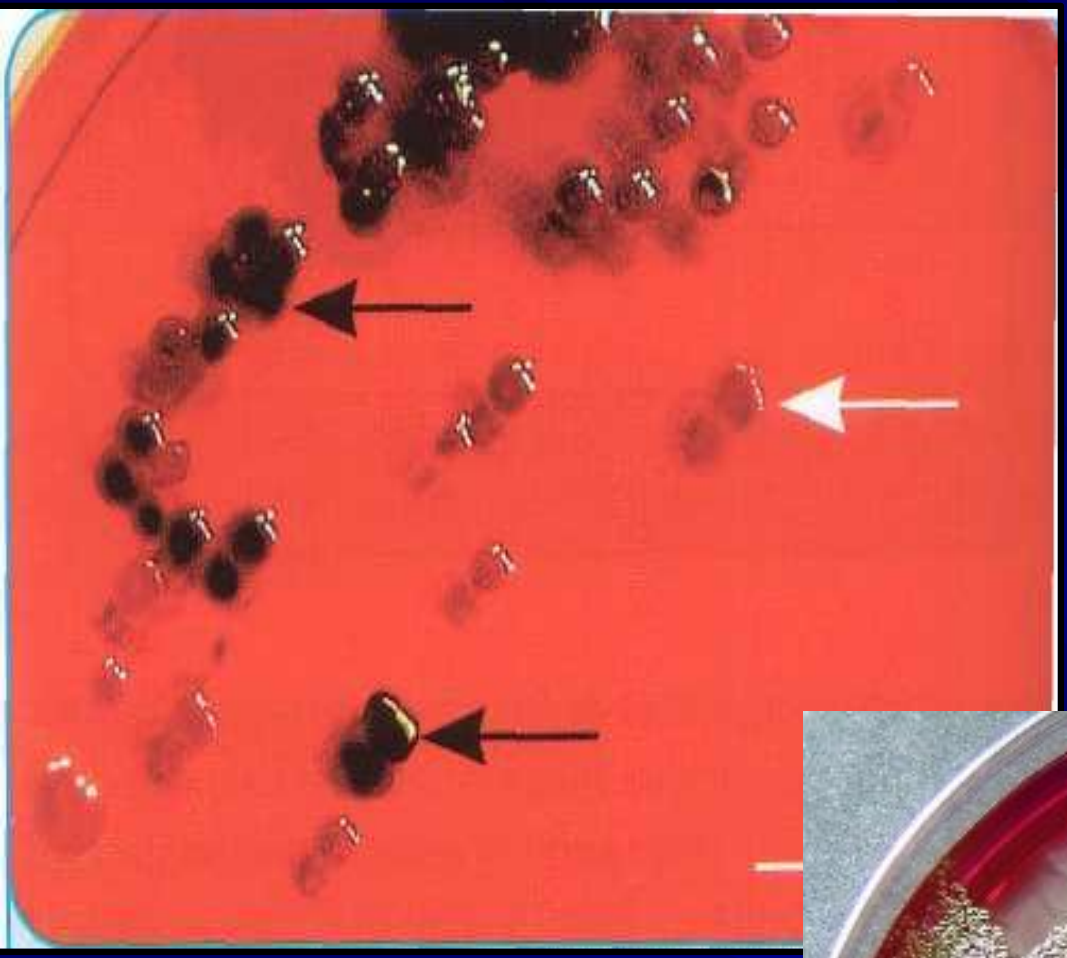
На среде Эндо- яркие малиновые колонии с характерным металлическим блеском.

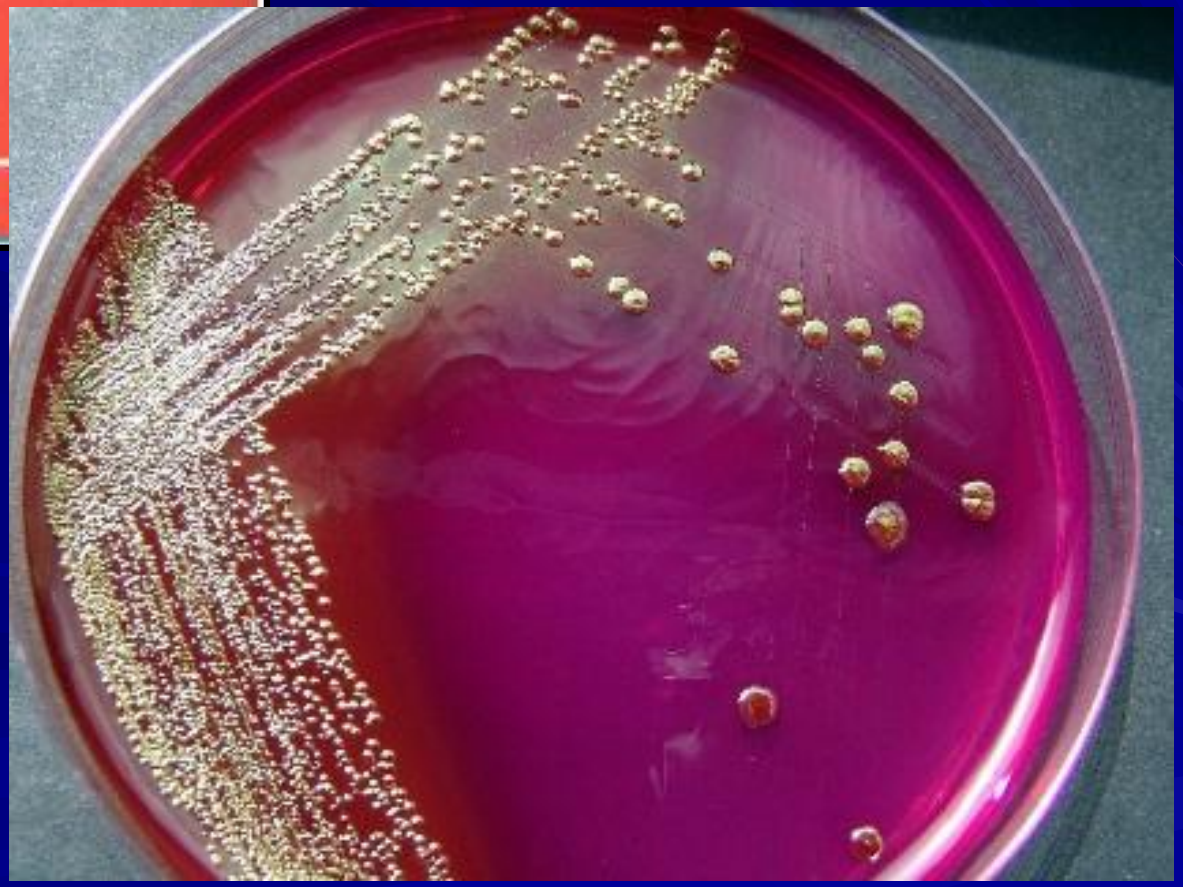
На среде Левина образуют темно-синие колонии с металлическим блеском,

на среде Плоскирева- бледно розовые.

На кровяном агаре могут образовывать зоны гемолиза.

В МПБ вызывают помутнение среды с образованием осадка.



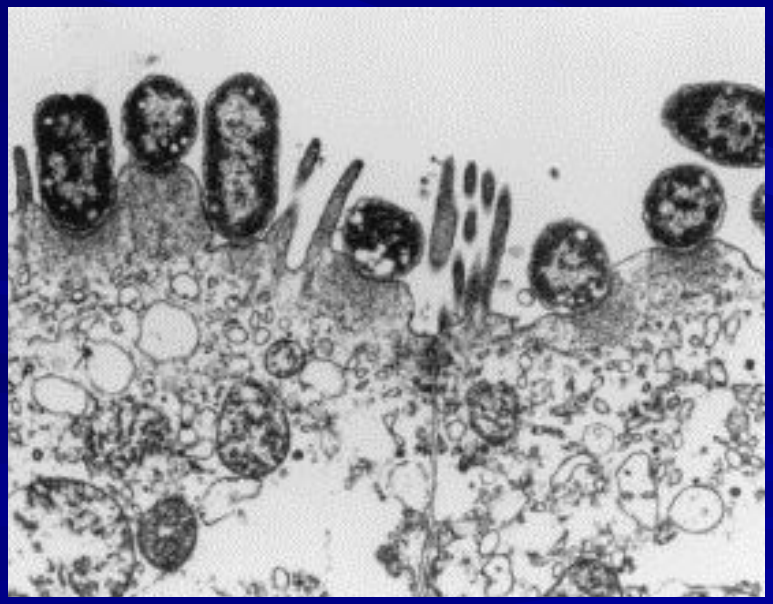


HARE
DIAGNOSTICS
opyright 2009 All rights reserved

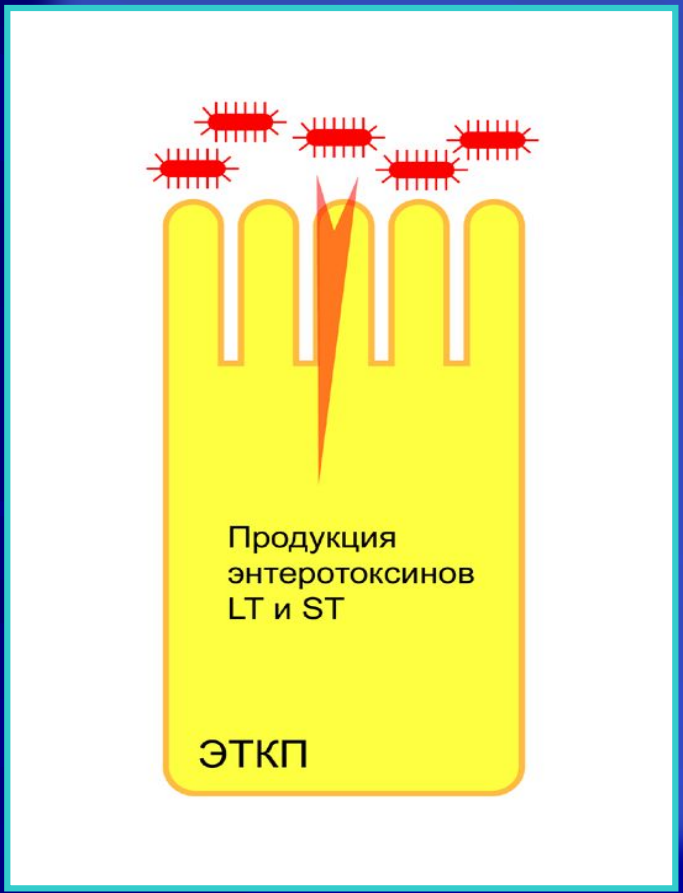
www.microbiologyinpictures.com
Escherichia coli
on blood agar

Факторы вирулентности

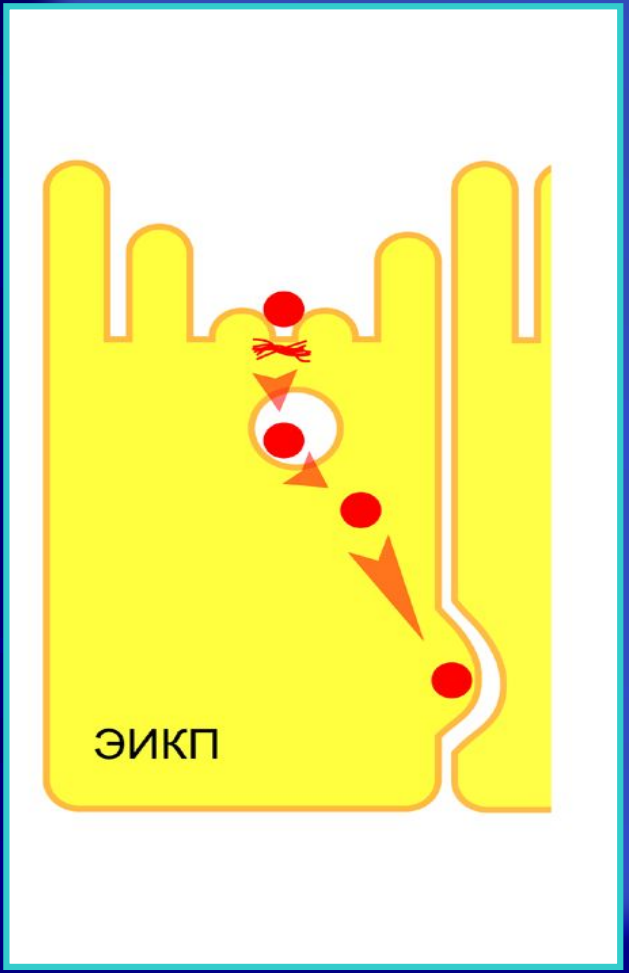
ЭПКП-энтеропатогенные	Белок адгезин и белок интимин наружной мембраны - разрушают микроворсинки и апикальную часть клеток, эндотоксин. Поражение тонкой кишки



ЭТКП-энтероток сигенные	Пили, факторы колонизации, термостабильный и термо-лабильный энтеротоксины (холероподобный).Поражение тонкой кишки



ЭИКП-энтероинвазивные	Поверхностные белки – инвазины и цитотоксины. Поражение толстой кишки



ЭГКП-энтерогемор-рагические	Пили, шигаподобные токсины, веротоксины, разрушающие эндотелий, белок интимин. Поражение толстой кишки

Группы веротоксинов

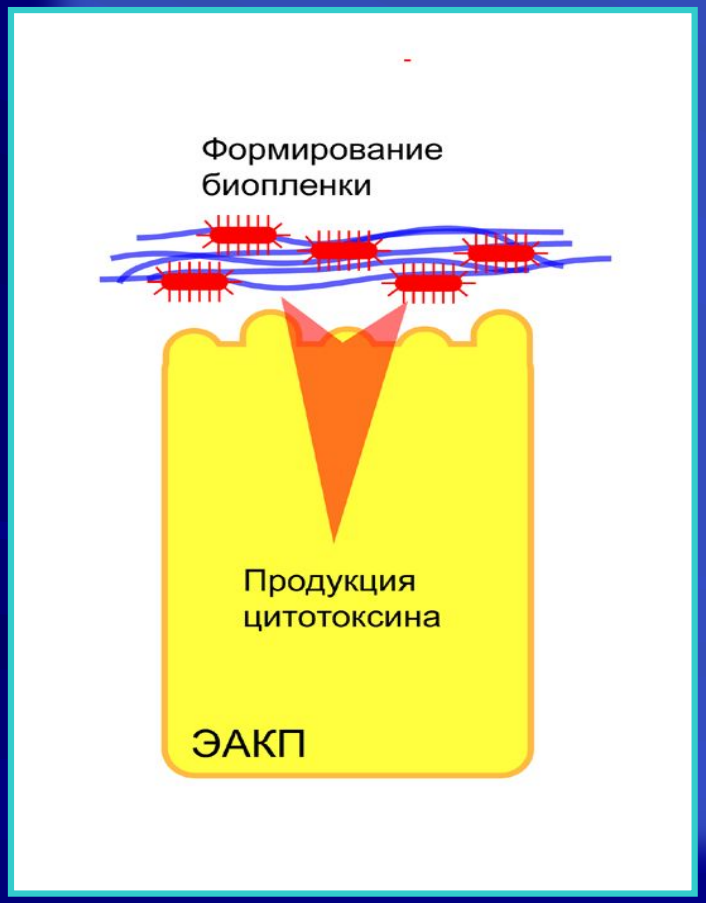
- веротоксины 1 (VT1, SLT1, Stx1)
- веротоксины 2 (VT2, SLT2, Stx2).

Штаммы ЕНЕС способны продуцировать либо только токсины первой (VT1) или второй группы (VT2), либо обе группы токсинов (VT1) и (VT2) одновременно.

Формы инфекционного процесса, обусловленного ЭГКП

- Носительство
- Неосложненная диарея
- Геморрагический колит
- Гемолитико-уремический синдром
- Тромботическая тромбоцитопеническая пурпура

ЭАКП-энтероагрегирующие	Агрегационное прикрепление, персистенция, цитотоксин. Поражение тонкой кишки.



03:H2; O15:H18; O44:H18; O111:H21; O127:H2;

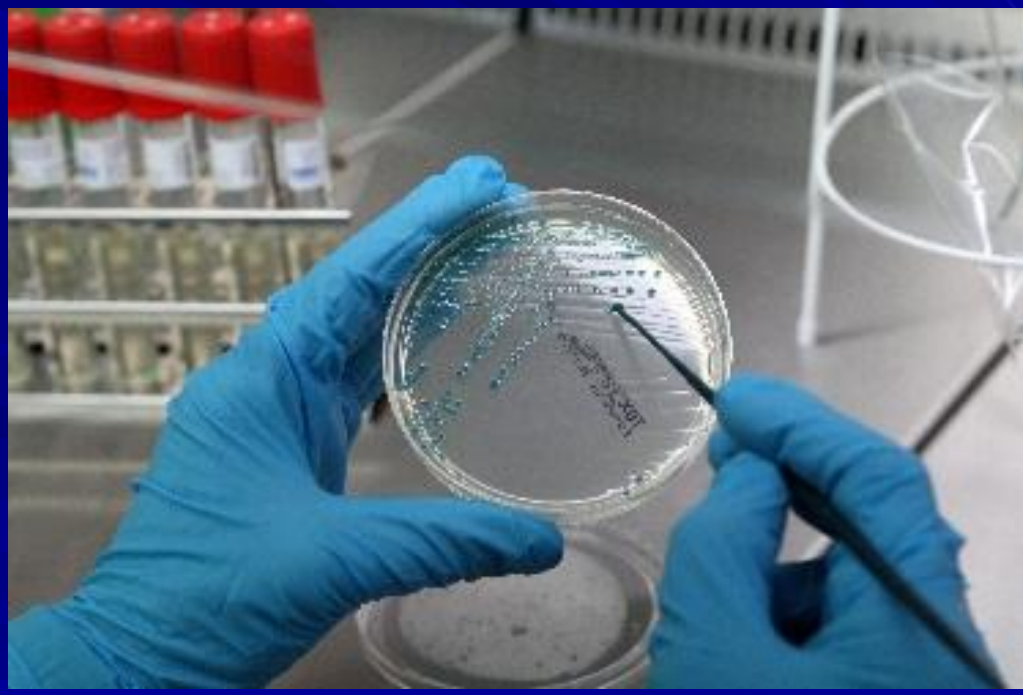
ДАКП-диффузионно-адгезирующие	Пили, ЛПС - выработка провоспалительных цитокинов, активация циклооксигеназы 2-повышение секреции, развитие воспалительной реакции. Поражение толстой кишки

Лабораторная диагностика

осуществляется

бактериологическим методом.

Материал для исследования:
Испражнения, рвотные массы, желчь, кровь, раневое отделяемое и др.



Escherichia coli

Глюкоза	Лактоза	Мальтоза	Маннит	Сахароза	Пептонная вода	
					индол	H_2S
КГ	КГ	КГ	КГ	-	+	-

Api strip inoculated with *Escherichia coli* - grown 24hr @37°C

БИОМЕД

ОАО "Биомед" им. И. И. Мечникова
143422, Московская обл., Красногорский р-н,
с. Петрово-Дальнее, тел.: (495) 635-45-45,
факс: (495) 630-15-68, www.biomedm.ru

СЫВОРОТКА
ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ
ЭШЕРИХИОЗНАЯ ОК
ПОЛИВАЛЕНТНАЯ
сухая для РА

ОКВ — 020:К84; 026:К60; 055:К59; 0111:К58

10 ампул по 1 мл

МУК 4.2.992-00 «Методы выделения и идентификации энтерогеморрагической кишечной палочки *E.coli* O157:H7»

Выделение и идентификация *ЕГКП*

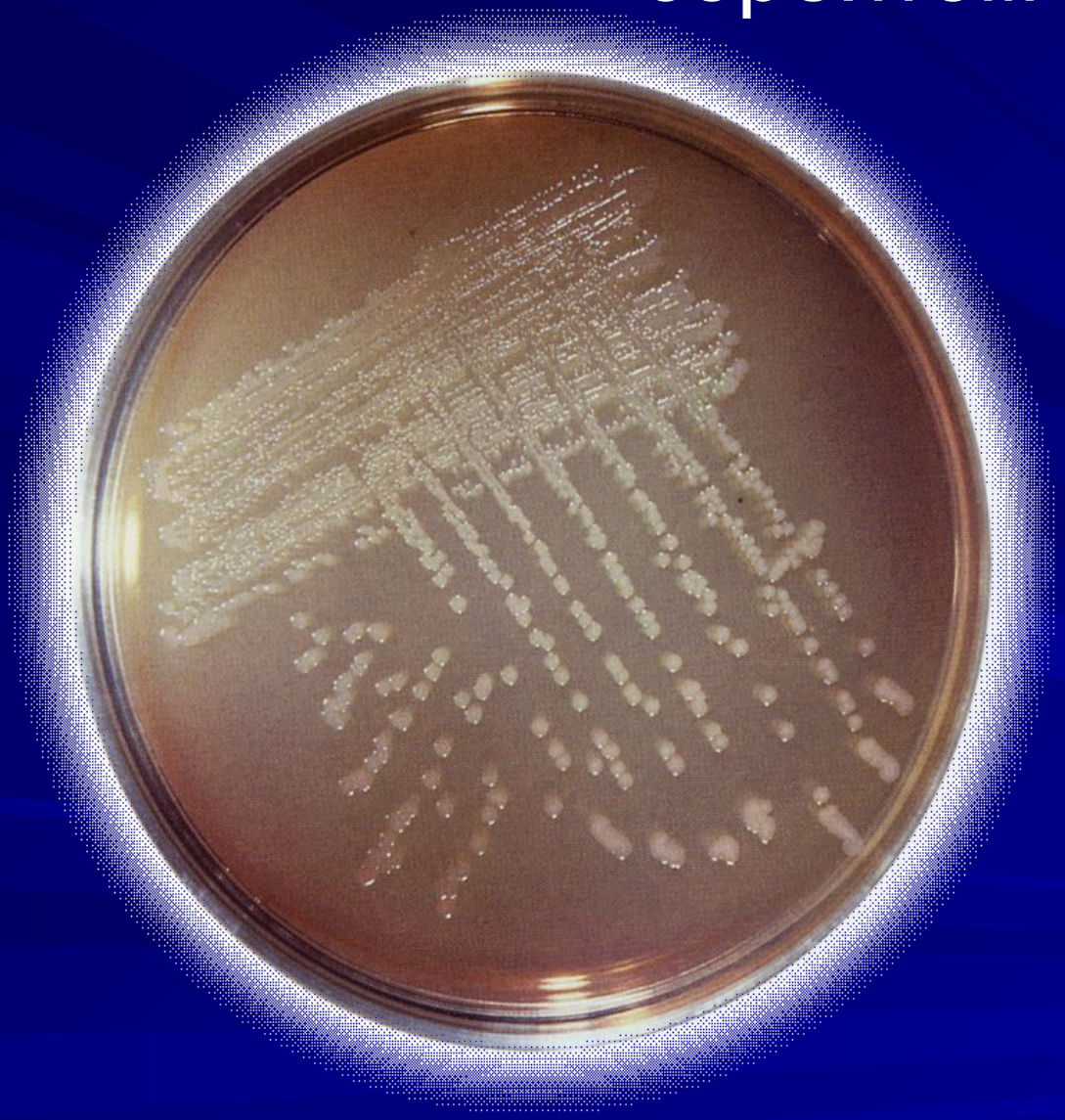
Исследуемый материал засевают на дифференциально-диагностические плотные питательные среды:

- МакКонки и Левина с антибиотиками: цефотаксимом (25 мкг/мл) и налидиксовой кислотой (4 мкг/мл),
- селективный агар с сорбитолом,
- а также на жидкие питательные среды для выделения и идентификации энтеробактерий

При исследовании классическим способом невозможно дифференцировать ЭГКП по культурально-ферментативным признакам.

Выделение E.coli O157:H7

- Посев на дифференциальную среду с сорбитом



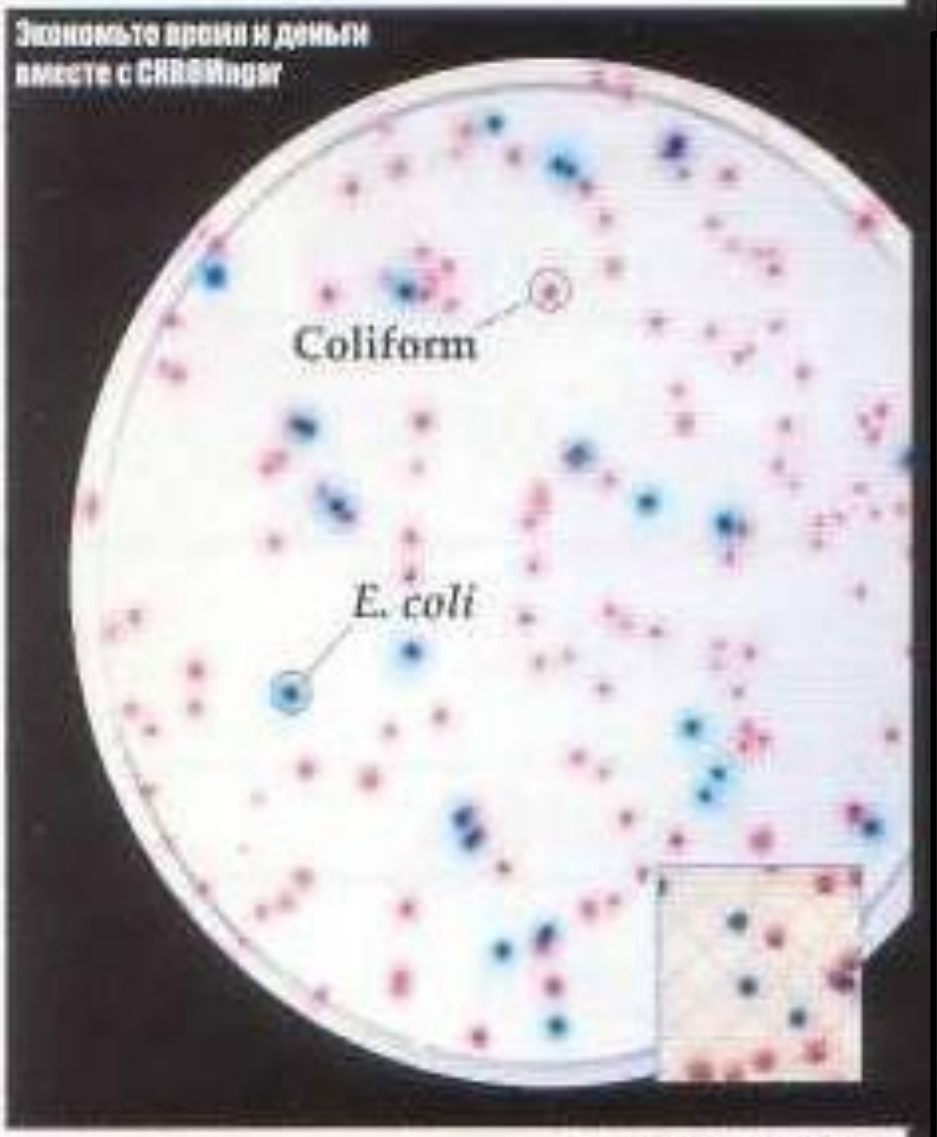
O157:H7 не способна ферментировать сорбитол.

Детальному исследованию на принадлежность к ЭГКП подлежат

- Лактозоположительные и
- Сорбитолотрицательные колонии.

Сорбитол- агар, обладает селективными и дифференциально- диагностическими свойствами в отношении ЭГКП.

CHROMagar™ ECC



Пионер Хромогенных Сред

CHROMagar

CHROMagar™ O157

CHROMagar

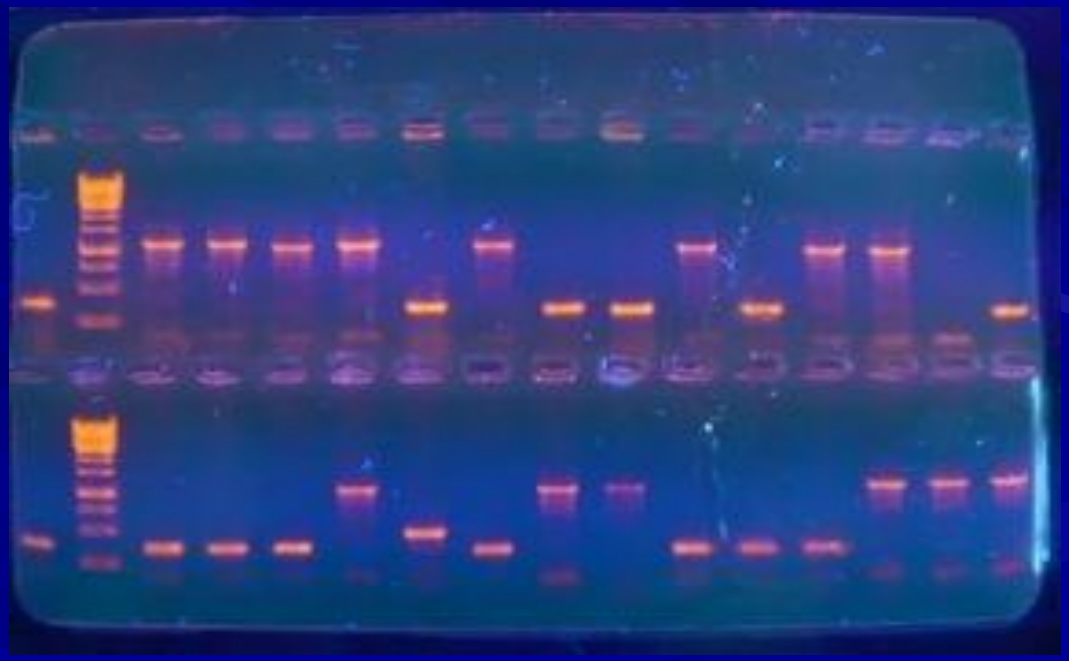
Экспресс-диагностика

- Автоматизированные системы:

API-20E, Enterotube, Laxema или отечественные «микроген» и др.

- ИФА- обнаружение типа энтеротоксина
- ПЦР для обнаружения генов вирулентности.

- РЛА с применением антительной латексной тест-системы для индикации эшерихий (серогруппы О104).
- РОПЛА (реакция обращенной пассивной латексной агглютинации), давшие положительную реакцию агглютинации, изоляты анализируют с помощью мультиплексной ПЦР-тест-системы



Специфическое лечение

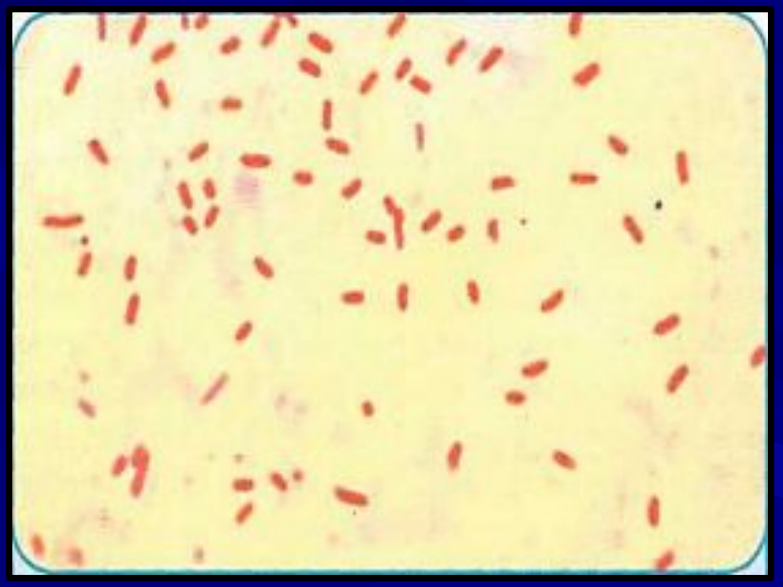
биопрепаратами: бифидумбактерин, лактобактерин, коли-протейный бактериофаги др.

Перед их приемом необходимо снижать кислотность желудочного сока (минерально-гидрокарбонатная вода)

- Лечебные фаги: коли-протейный бактериофаг, колифаг, интести-фаг, сальмонеллезный бактериофаг, дизентерийный и др.
- Препараты для коррекции микрофлоры кишечника: бифидумбактерин форте, пробиформ, бифиформ и др.

Возбудители дизентерии

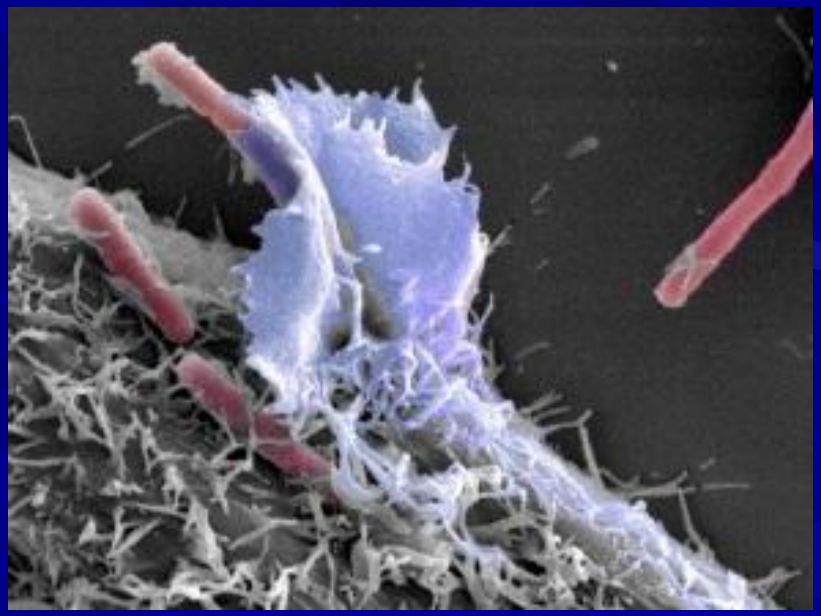
Морфология



Международная классификация шигелл

Подгруппа	Серовар	Подсеровар	Антигенная формула	
			Типовой антиген	Групповые антигены
A. S.dysenteriae	1-12		1-12	
B. S.flexneri	1	1a	I	3,4
		1b	I	3,4,6
	2	2a	II	3,4
		2b	II	7,8
	3	3a	III	6,7,8
		3b	III	3,4,6,7,8
	4	4a	IV	3,4
		4b	IV	(3,4),6
	5	5a	V	(3,4)
		5b	V	7,8
		x-variant	-	7,8
		y-variant	-	3,4
	6		VI	
C. S.boydii	1-18		1-18	
D. S.sonnei	-			

- Серовар -шигелла Григорьева-Шига, (ИД- 10 микробных клеток), наиболее патогенен из всех известных дизентерийных микробов.
- Shigella Flexneri - менее патогенный возбудитель. Для инфицирования требуется около 100 микробных клеток, но этот вид более устойчив во внешней среде



- Shigella Sonnei - самая устойчивая из всех возбудителей дизентерии, размножается в продуктах питания ИД- 10 млн. клеток.

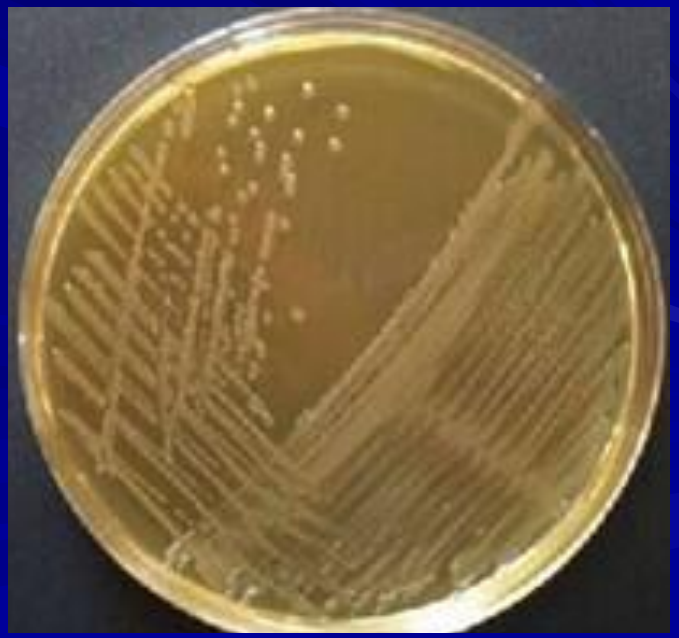
Факторы вирулентности шигелл	
Факторы вирулентности	Биологический эффект
Ipa BCD-инвазины	Ipa(invasion plasmide antigen)Инвазины белки наружной мембраны бактерий, которые прикрепляются к апикальной мембране М-клеток; вызывают лизис мембран эукариотических клеток, обеспечивают внутриклеточное и межклеточное распространение шигелл
Экзотоксин (шигатоксин)	Вызывает повреждение эндотелия ,поражение почек с гемолитическим и уремическим синдромом, нарушения водно-солевого обмена и ЦНС
Эндотоксин	Общая интоксикация, усиление перистальтики кишечника

Культуральные свойства

Факультативные анаэробы. Температурный оптимум роста 37 градусов.

На плотных средах образуют гладкие и шероховатые колонии (R-формы), полупрозрачные.

Дифференциально-диагностическим является рост на средах Эндо, Плоскирева, среде Мак-Конки- образуют бесцветные колонии.



Лабораторная диагностика

Бактериологический метод диагностики - :

исследование фекалий с последующим выделением и идентификацией возбудителя.

Для ускоренной диагностики

- РИФ , ИФА, иммуноадсорбцию

Серологическое исследование- дополнительное:

- РНГА;
- развернутая реакция агглютинации

Импортные среды

- Слабая селективность
  - MacConkey
  - Eosin methylene blue agar
  - Tergitol- agar
- Средняя селективность
  - Desoxycholate agar
  - Xylose-lisine-desoxycholate agar
- Высокая селективность
  - Salmonella-Shigella agar
  - Hektoen agar

На жидких средах

- S- формы колоний дают равномерное помутнение,
- R-формы- придонный осадок, при этом среда остается прозрачной.

Биохимические свойства

- хемоорганотрофы с дыхательным и ферментативным метаболизмом. Оксидазо-отрицательны, каталазоположительны.
- Углеводы разлагают с образованием кислоты. Не ферментируют лактозу, не образуют сероводорода.
- Sh. dysenteriae –не ферментируют маннит,
- Представители серогрупп В,С,Д- маннит-положительны.
- Наиболее биохимически активны Sh.sonnae, которые медленно (на 3-4 сутки)сбраживают лактозу

Дифференциация шигелл по биохимическим свойствам

		Ман	Глю (газ)	Лак	Инд	Гли	Орн	Сор	Дул	Кси	Раф
S.dysenteriae		-	-	-	-,+	x	-	x	-	x	-
S.flexneri	1-5	+	-	-	-,+	-	-	x	-	-	
	6	+,-	-,+	-	-	+,(+)	-	x	x	x	-
S.boudii		+	-	-	-,+	+,(+)	-	x	x	x	-
S.sonnei		+	-	(+)	-	x	+,(+)	-	-	x	x

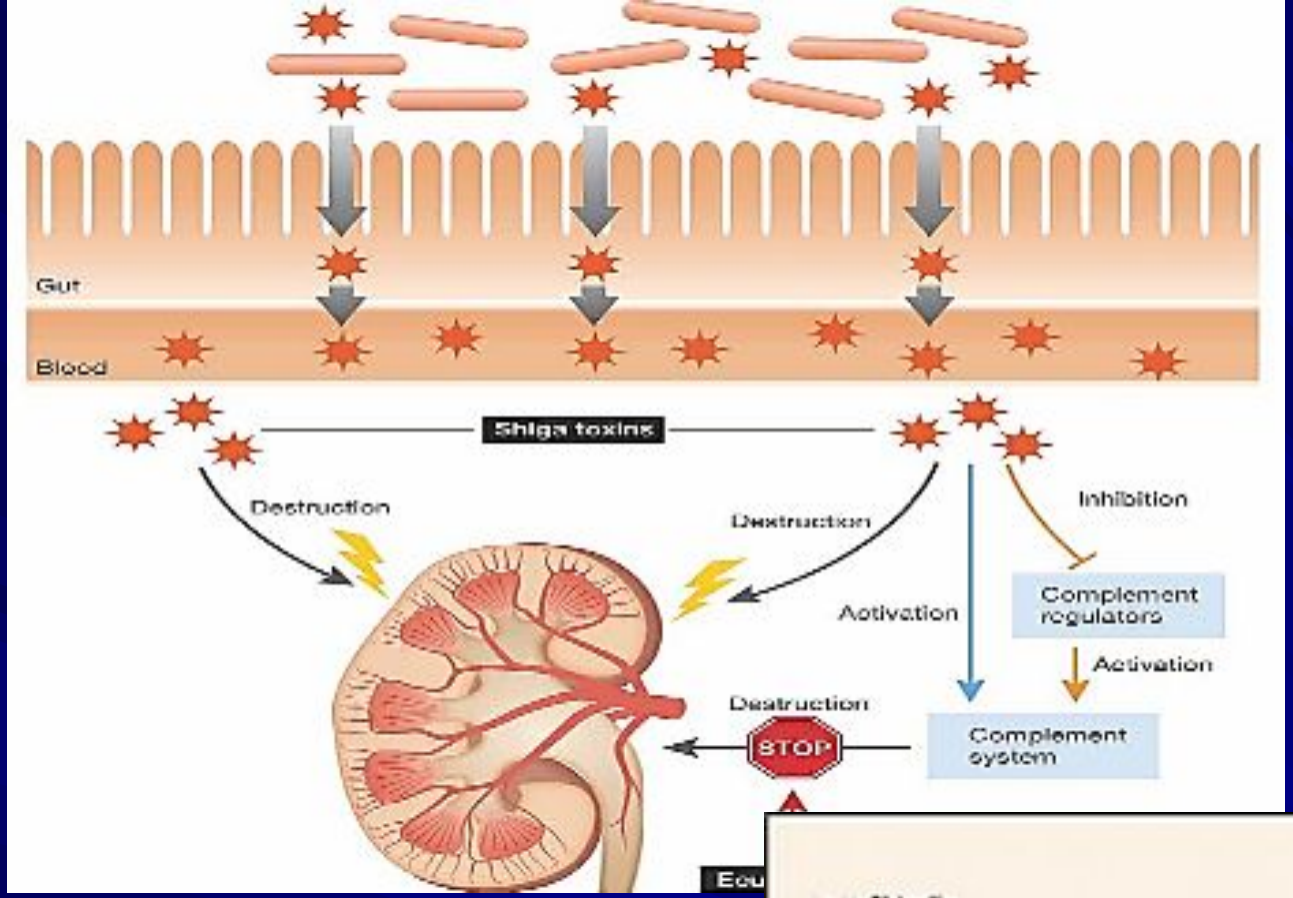
8-28 Characteristic reactions of *Shigella* spp.

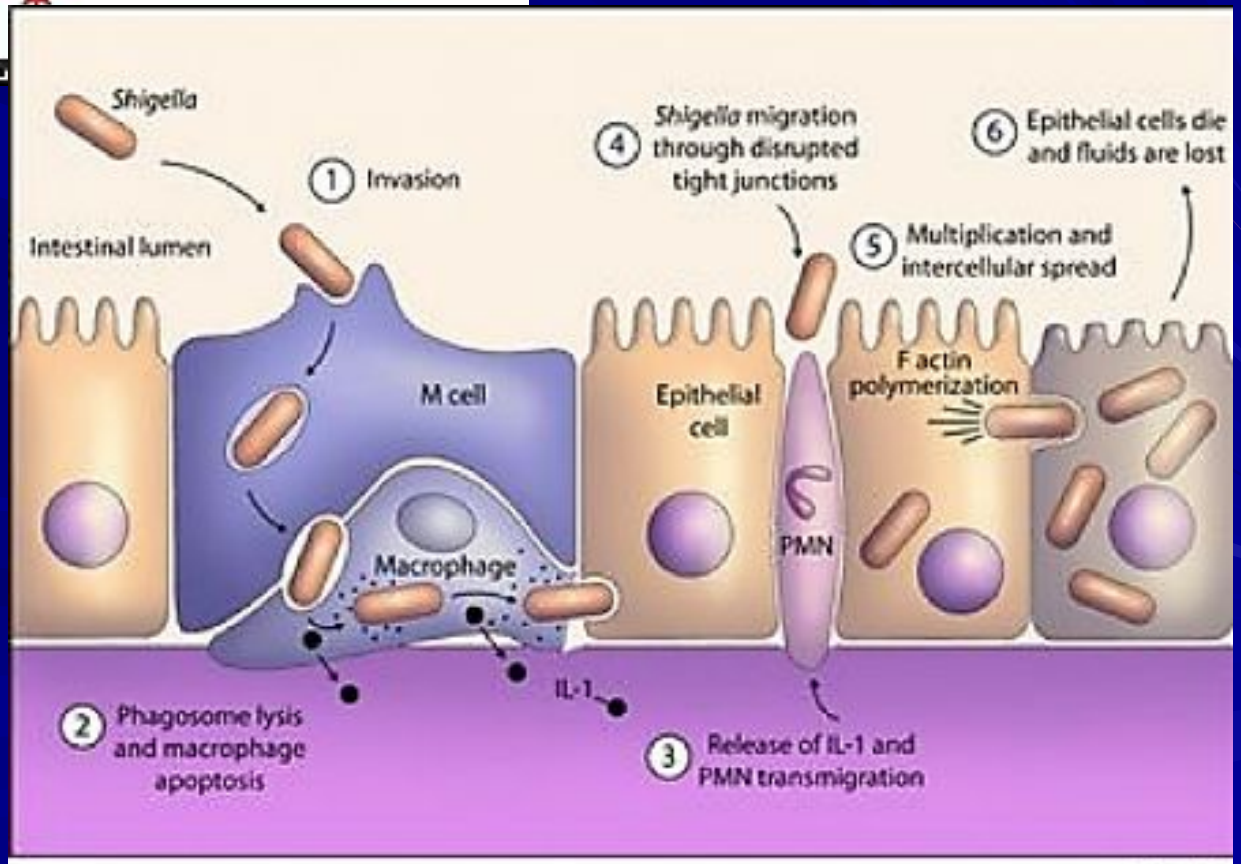
Внутривидовое типирование шигелл

- Биотипирование
  - Определение биохимической активности по отношению к отдельным углеводам
- Колициногенотипирование
  - Определение спектра продуцируемых колицинов
- Колицинотипирование
  - Определение спектра колицинов, к которым чувствительна данная культура

Факторы вирулентности шигелл

Факторы вирулентности	Биологический эффект
Ipa BCD-инвазины	Ipa(invasion plasmide antigen)Инвазины белки наружной мембраны бактерий, которые прикрепляются к апикальной мембране М-клеток; вызывают лизис мембран эукариотических клеток, обеспечивают внутриклеточное и межклеточное распространение шигелл
Экзотоксин (шигатоксин)	Вызывает повреждение эндотелия ,поражение почек с гемолитическим и уремическим синдромом, нарушения водно-солевого обмена и ЦНС
Эндотоксин	Общая интоксикация, усиление перистальтики кишечника


Gut
Blood
Shiga toxins
Destruction
Destruction
Inhibition
Activation
Complement regulators
Activation
Destruction
STOP
Complement system

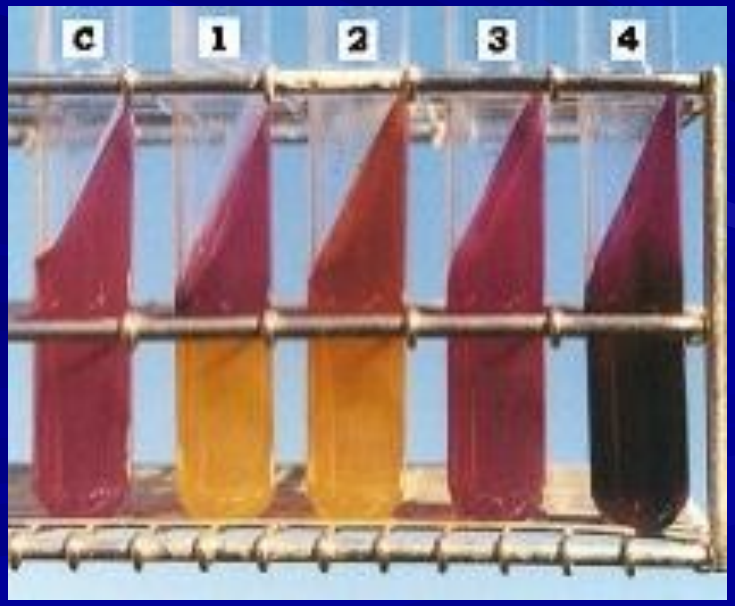

Shigella
1 Invasion
Intestinal lumen
4 Shigella migration through disrupted tight junctions
6 Epithelial cells die and fluids are lost
5 Multiplication and intercellular spread
M cell
Epithelial cell
F actin polymerization
PMN
Macrophage
IL-1
2 Phagosome lysis and macrophage apoptosis
3 Release of IL-1 and PMN transmigration

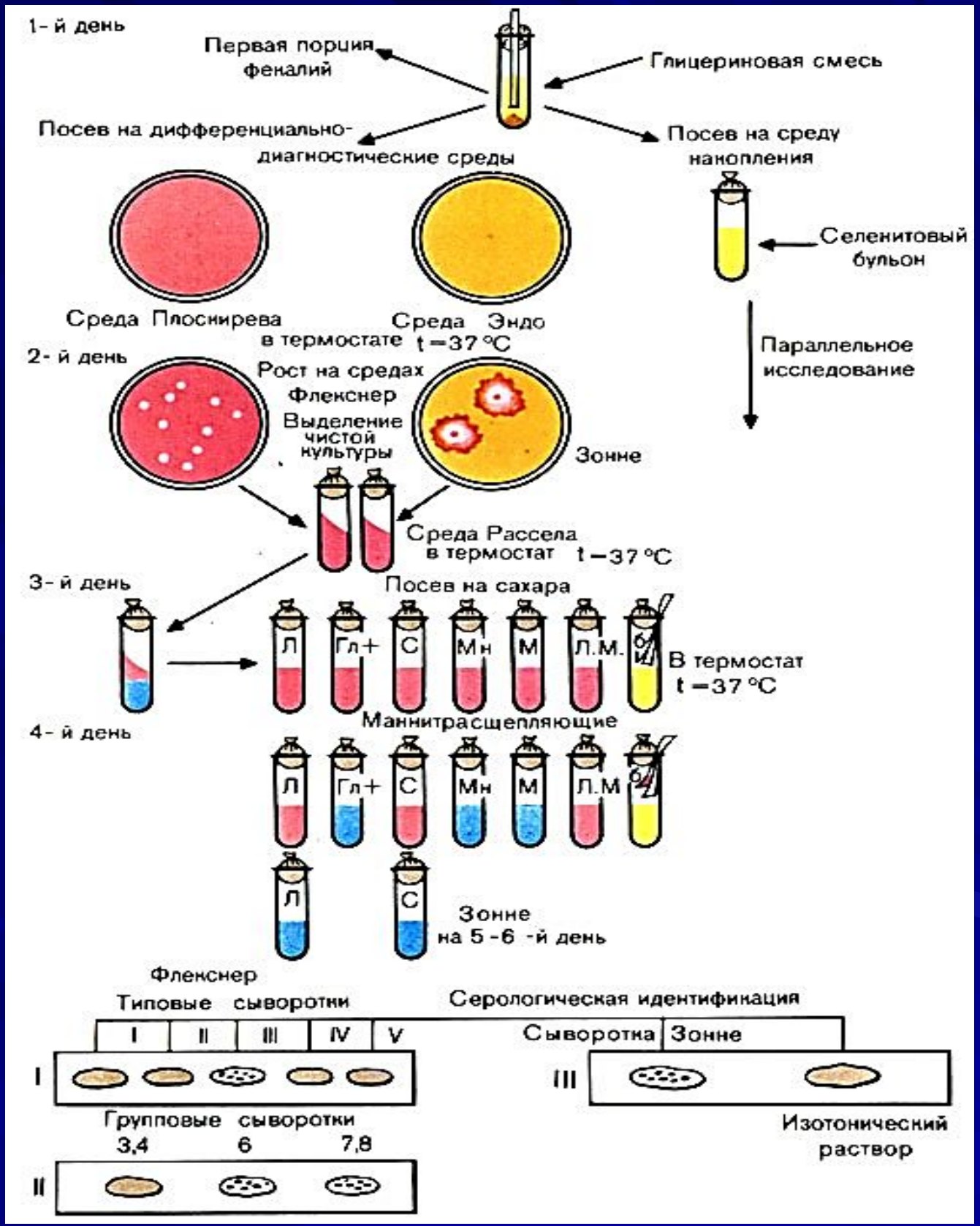
Лабораторная диагностика

Основной метод диагностики - бактериологический:

исследование фекалий с последующим выделением и идентификацией возбудителя по биохимическим и серологическим свойствам

(в РА с поли- и моновалентными сыворотками и определением чувствительности к бактериофагам.

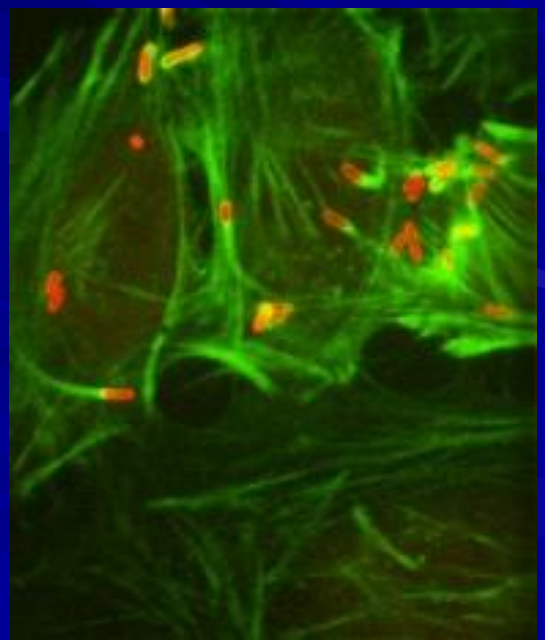



1- й день
Первая порция фекалий
Глицериновая смесь
Посев на дифференциально-диагностические среды
Посев на среду накопления
Селенитовый бульон
Среда Плоскирева
Среда Эндо
в термостате t =37 °C
Параллельное исследование
2- й день
Рост на средах Флекснер
Выделение чистой культуры
Зонне
Среда Рассела
в термостат t –37 °C
3- й день
Посев на сахара
Л
Гл+
С
Мн
М
Л.М.
В термостат t =37 °C
Маннитрасщепляющие
4- й день
Л
Гл+
С
Мн
М
Л.М
Л
С
Зонне на 5 -6 -й день
Флекснер
Типовые сыворотки
Серологическая идентификация
I
II
III
IV
V
Сыворотка
Зонне
I
III
Групповые сыворотки
3,4
6
7,8
II
Изотонический раствор

Для ускоренной диагностики

Используют:

- РИФ , ИФА, иммуноадсорбцию
- Серологическое исследование- дополнительное, когда не удается выделить культуру возбудителя при наличии клинической картины или в тех случаях когда больной принимал антимикробные препараты.



Серологическая диагностика

- РНГА (диагностический титр 1/200);
- развернутая реакция агглютинации с моновалентными диагностикумами (дизентерийный Видаль). Кровь нужно брать с 5-го дня максимальные титры на 2-й неделе болезни.

Исследование проводится в динамике.

Этиотропная терапия

- нитрофурановыми препаратами (фуразолидон),
- Возможно применение других антимикробных препаратов (триметоприм).

К антибиотикам часто формируется резистентность.

Специфическая терапия

проводится поливалентными бактериофагами

(в сухом, жидком виде или свечей)

Сальмонеллы

Сем: Enterobacteriaceae

Род: Salmonella

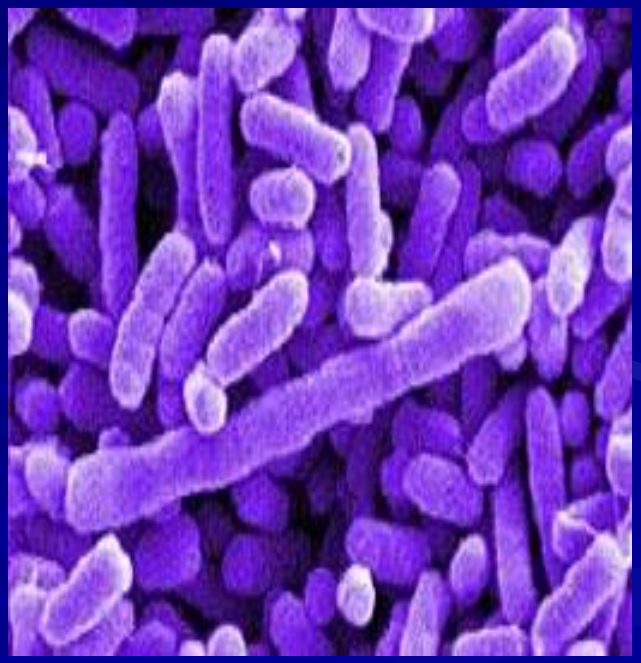
Вид:

- **Salmonella enterica**
  - **subsp. choleraesuis**
  - **subsp. salamae**
  - **subsp. arizone**
  - **subsp. diarizonae**
  - **subsp. houtenae**
  - **subsp. Indica**
- **Salmonella bongori**

Морфология

Сальмонеллы -подвижные, грамотрицательные палочки размером 1-5 мкм, перитрихи, спор и капсул не образуют.

Могут образовывать атипичные, фильтрующиеся L-формы бактерий. В мазках располагаются одиночно, беспорядочно



Антигенная структура

- О-антиген (соматический, термостабильный)

  Разрушается под действием фенола.

  О-АГ состоит из R-ядра и S- полисахаридной цепи. Глубинные АГ клеточной стенки:

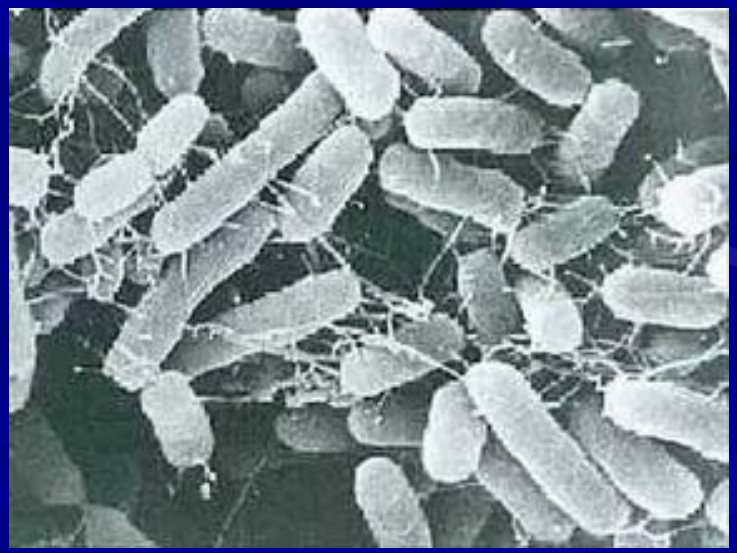
  Q- и T- белковые, R1 и R2- полисахаридные
- Н-антиген (жгутиковый), белковый, термолабилен, (двухфазный) разрушается при кипячении.
- поверхностные: Vi-антиген - и М-антиген

  М-антиген- кислый полисахарид, разрушается кислотой и этанолом, не растворим в воде, слабый антиген.

Vi-антиген обладает иммуногенными свойствами.

В зависимости от его количественной выраженности выделяют V - или W- формы антигена.

- Vi-антиген V- формы - не агглютинируется О-сыворотками
- Vi-антиген W- формы- агглютинируется О-сыворотками



Классификация сальмонелл

предложена в 1934 г Ф.Кауфманом и Уайтом (основана на АГ- свойствах).

- Внутри 6 подвидов сальмонеллы разделены по О-АГ на серологические группы, от 1 до 67 (от А до Z и цифрами).
  Групп С (подгруппы С1, С2,С3,С4).

- В состав группы входит до нескольких десятков сероваров сальмонелл.

Таблица 20.3. **Серологическая классификация сальмонелл**

Серогруппа, вид или серовар	О-антиген	Н-антиген	
		фаза 1	фаза 2
Серогруппа A			
S. paratyphi A	1, 2, 12	a	(1, 5)
Серогруппа B			
S. paratyphi	1, 4(5), 12	b	1, 2
S. abony	1, 4(5), 12, 27	b	e, n, x
S. typhimurium	1, 4(5), 12	i	1, 2
S. derbi	1, 4(5), 12	fg	(1,2)
S. wien	1, 4, 12, 27	b	—
S. haifa	1, 4(5), 12	z	1, 2
S. heidelberg	1, 4(5), 12	r	1, 2
Серогруппа C_1			
S. choleraesius	6, 7	(c)	1, 5
S. montevideo	6, 7	g, m, (p), S	(1, 2, 7)
S. leopoldville	6, 7	b	z
S. bonn	6, 7	l, v	e, n, x
Серогруппа D			
S. typhi	9, 12	d	—
S. enteritidis	1, 9, 12	g, m	(1, 7)
S. dublin	1, 9, 12	g, p	—
S. rostock	1, 9, 12	g, p, u	—
S. moscow	9, 12	g, q	—
S. gallinarum	1, 9, 12	s, q	—
Серогруппа E_1			
S. london	3, 10	l, v	1, 6
S. anatum	3, 10	e, h	1, 6
S. amsterdam	3, 10	g, m, s	—
S. zanzibar	3, 10	k	1, 5

По набору специфических Н-АГ сальмонеллы делят на фазы.

- Первая фаза содержит Н-АГ специфичные для данного серовара. Она выделена строчными буквами латинского алфавита.
- Вторая фаза- неспецифическая, обозначают буквами или цифрами.

У большинства сальмонелл обнаруживаются обе фазы Н-АГ. Сальмонеллы имеющие одну из фаз неподвижны.

Биохимические свойства

факультативные анаэробы, расщепляют глюкозу с образованием кислоты или кислоты и газа.

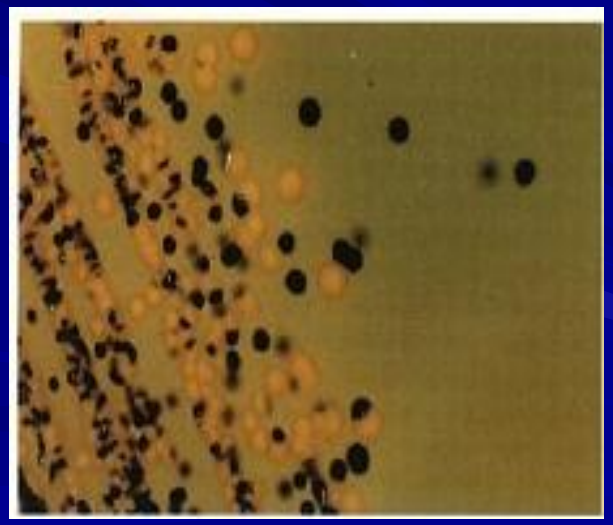
Дифференцируют по отношению к углеводам: манниту, мальтозе, арабинозе, сорбиту.

Утилизируют аммиак, образуют сероводород, содержат декарбоксилазы аминокислот: лизин-, орнитин-, аргинин- , оксидазо “-“.

Культивирование сальмонелл

Оптимум роста 35- 37 оС , pH 4,1-9,0.

Угнетают рост сальмонелл высокие концентрации соли и сахара. Хорошо растут на средах с добавлением желчи. На висмут-сульфит агаре сальмонеллы образуют черные колонии с характерным металлическим блеском.



Рост сальмонелл на XLD Medium и Hektoen Enteric Agar

XLD MEDIUM,
S.enteritidis

HEKTOEN ENTERIC AGAR,
S.typhimurium

THE OXOID MANUAL, 1995

Патогенез тифо-паратифозных заболеваний

- Инкубационный период составляет от 10-14 дней до 3 нед.
- Попадание микроба в рот, возможно внедрение в лимфатические образования глотки с развитием катарального воспаления.
- Далее микробы попадают в желудок, частично гибнут и проходят в тонкую кишку, где есть все благоприятные условия для развития сальмонелл (щелочная среда и др.)

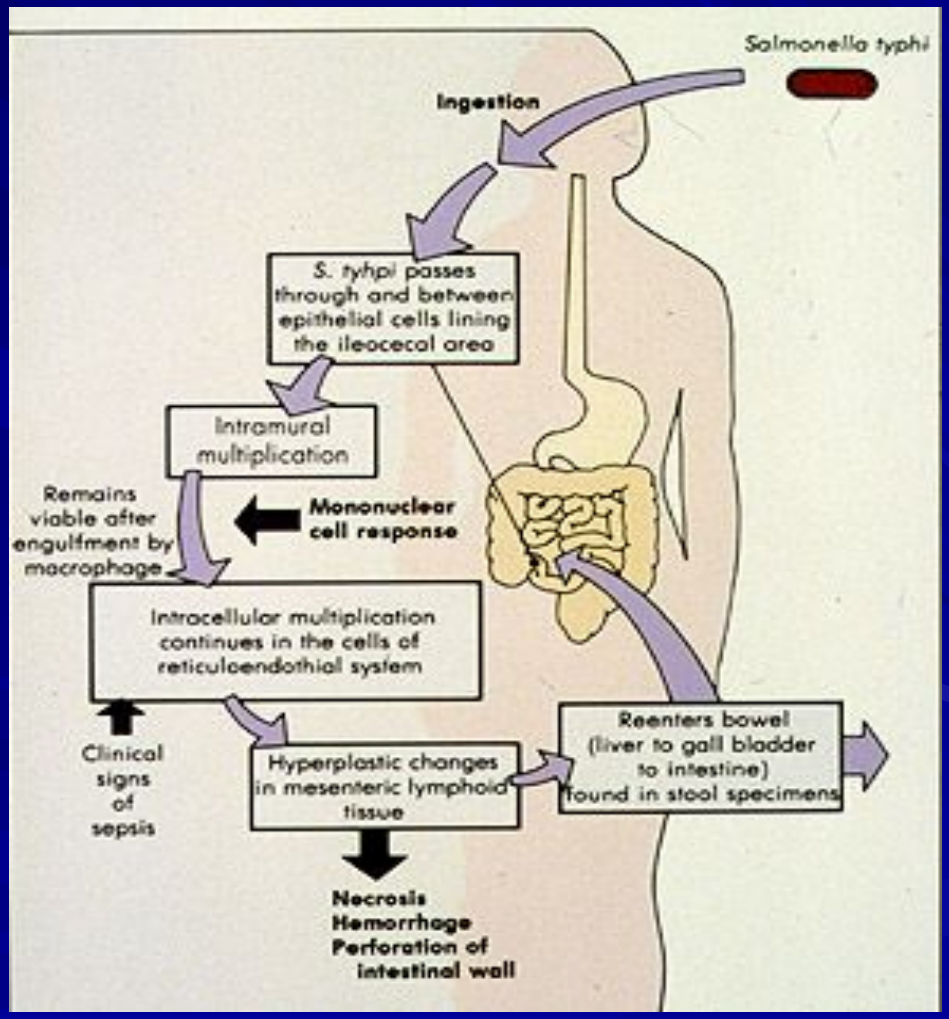
- микробы проникают в лимфатические образования тонкой кишки (пейеровы бляшки), где активно размножаются.
- Микробы накапливаются и лимфогенно проникают в мезентериальные лимфатические узлы.

Все это происходит в инкубационном периоде (от 10-14 дней до 3 недель), клинических проявлений нет.

В результате развивается гиперплазия лимфоузлов, образование гранулем с крупными тифозными клетками, а в последующем и других органах.

- Накопление возбудителя и прорыв в ток крови с развитием бактериемии.

С этого момента появляются клинические признаки заболевания.



- Под действием факторов крови микробы частично погибают и освобождаются эндотоксины.

Эндотоксинемия клинически проявляется симптомами интоксикации, лихорадкой, поражением ЦНС.

Эндотоксины действуют на сосуды приводя к микроциркуляторным нарушениям, перераспределению крови.

- С током крови микроб разносится в различные ткани: поражается печень (наиболее часто), селезенка, костный мозг и кожа.

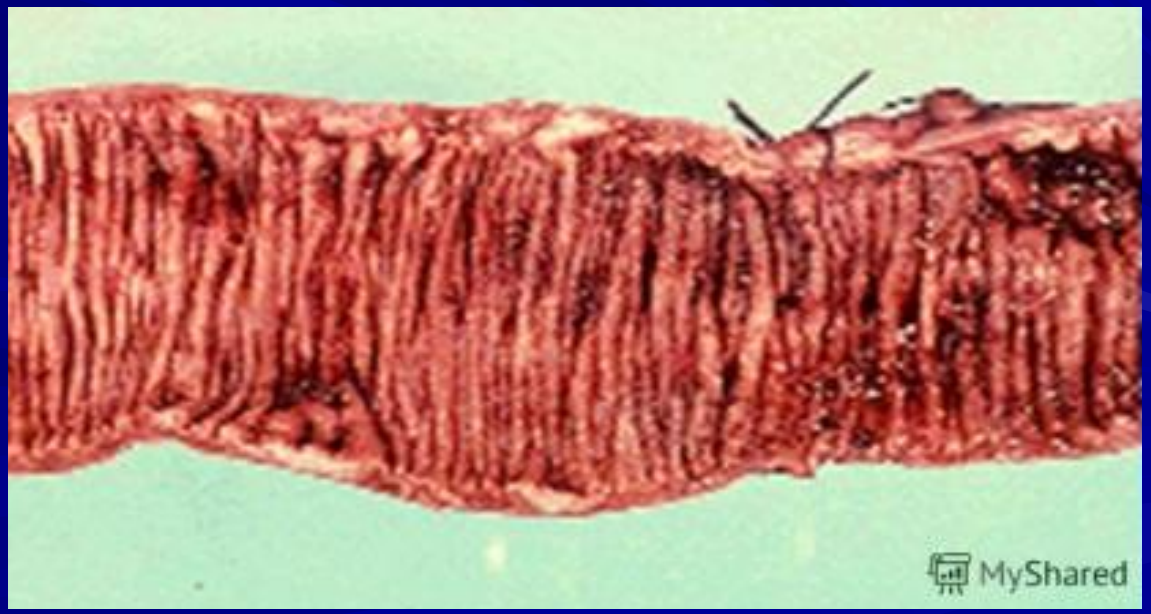
В этих органах образуются вторичные очаги воспаления и также образуются брюшнотифозные гранулемы.

Из этих очагов и из мест первичной локализации периодически микробы поступают в кровь, поддерживая бактериемию,

- фаза выведения возбудителя из организма. Начинается примерно со 2 недели. Микроб выделяется в окружающую среду через почки, печень и желчевыводящие пути в кишечник.

- Повторно попадая в кишечник, сальмонеллы проникают в ранее сенсибилизированные лимфоидные образования, что приводит к развитию аллергической реакции в тонкой кишке (феномен Артюса).

В кишечнике идет образование язв, возможна перфорация.



Лабораторная диагностика

Бактериологический метод - выделение чистой культуры возбудителя, ее идентификация до вида и последующее определение внутривидовых эпидемиологических маркеров

Лабораторная диагностика

Материал для бактериологического исследования

- кровь
- испражнения,
- моча,
- желчь (дуоденальное содержимое).

Получение гемокультуры и миелокультуры

С этой целью кровь или пунктат костного мозга засевают на среду Рапопорта в соотношении 1:10.

Посевы инкубируют при 37 °С в течение 8 дней, а с учетом выделения L-форм бактерий – до 3-х недель.

Серологические методы диагностики

- Развернутая РА с моновалентными диагностикумами для обнаружения О-АТ и Н-АТ против возбудителя брюшного тифа и паратифов А и В.
- РПГА с эритроцитарным диагностикумом.

Для ускоренной диагностики используют:

реакции ко-агглютинации, РИФ, ИФА, ДНК-зондирование.

Специфическая профилактика

В настоящее время применяется химическая сорбированная брюшнотифозная вакцина (по эпидпоказаниям), спиртовая брюшнотифозная вакцина обогащенная Vi-АГ, брюшнотифозная ви-полисахаридная вакцина S.typhi:

ВИ-АНВАК(Россия) с 3-х лет,

ТИФИМ Ви (Франция) с 5 лет.

Продолжительность поствакцинального иммунитета -3 года.

- Контактным лицам, при опасности возникновения заболевания назначают брюшнотифозный бактериофаг.

- Этиотропная терапия применяют левомицетин (препарат выбора), ампициллин, фторхинолоны и др.

Благодарим за внимание!