

Микробиология и лабораторный диагноз возбудителей острых кишечных инфекций



Этиологическая структура возбудителей ОКИ

Насчитывает до 500 нозологических форм

- Патогенные и условно-патогенные представители семейства *Enterobacteriaceae*;
- Вибрионы;
- Кампилобактерии;
- Аэромонады;
- Клостридии;
- Стафилококки;
- Кишечные вирусы (ВГА, ВГЕ, рота-, энтеровирусы, вирусы полимиелита);
- Патогенные простейшие (амебы, лямблии).

Семейство Enterobacteriaceae

включает более 40 родов согласно
Определителю бактерий Берджи (2004)

Клинически значимые для человека:


патогенные роды *Shigella*, *Salmonella*,
Escherichia, *Yersinia*, *Klebsiella*

Условно-патогенные: *Enterobacter*, *Proteus*,
Providencia и др.

Характеристика семейства

Грам-отрицательные подвижные и неподвижные палочки, некоторые синтезируют капсулу, не образуют спор. Факультативные анаэробы, хорошо растут на обычных питательных средах при 37 °С, обладают высокой ферментативной активностью по отношению к углеводам, спиртам, аминокислотам. Каталазоположительны (за искл. *S. dysenteriae* 1)

Ключевые биохимические тесты:



Способность ферментировать глюкозу

Восстанавливать нитраты в нитриты

Утилизировать углеводы по ферментативному типу

Отсутствие фермента оксидазы
(кроме представителей рода *Plesiomonas*)

Род *Shigella*

- Выделены Кастеллани и Чалмерс в 1919 г. Названы в честь Киёси Шига, описавшего ТИПОВОЙ ВИД.

Различают **4** вида шигелл:

- Подгруппа **A** – *S. dysenteriae*;
- **B** – *S. flexneri*;
- **C** – *S. boydii*;
- **D** – *S. sonnei*.

Морфогические и культуральные свойства

- Палочки с закругленными концами длиной до 2 – 3 мкм. Грам «-». Лишены жгутиков, неподвижны, не образуют спор и капсул. На поверхности клеток расположены реснички, обуславливающие адгезию к клеткам эпителия слизистой оболочки кишки. Факультативные анаэробы. Т° оптимум 37°С, рН 7,2.
- Хорошо растут на обычных средах в виде гладкой, шероховатой и переходной форм.

Морфология шигелл и сальмонелл в мазках по Граму

Возбудители сальмонеллезов

(*S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. choleraesuis* и др.)

Сальмонеллезы — заболевания людей и животных, вызванные бактериями рода *Salmonella*, семейства *Enterobacteriaceae*.



Рис. 3.50. Мазок *S. enteritidis*. Окраска по Граму

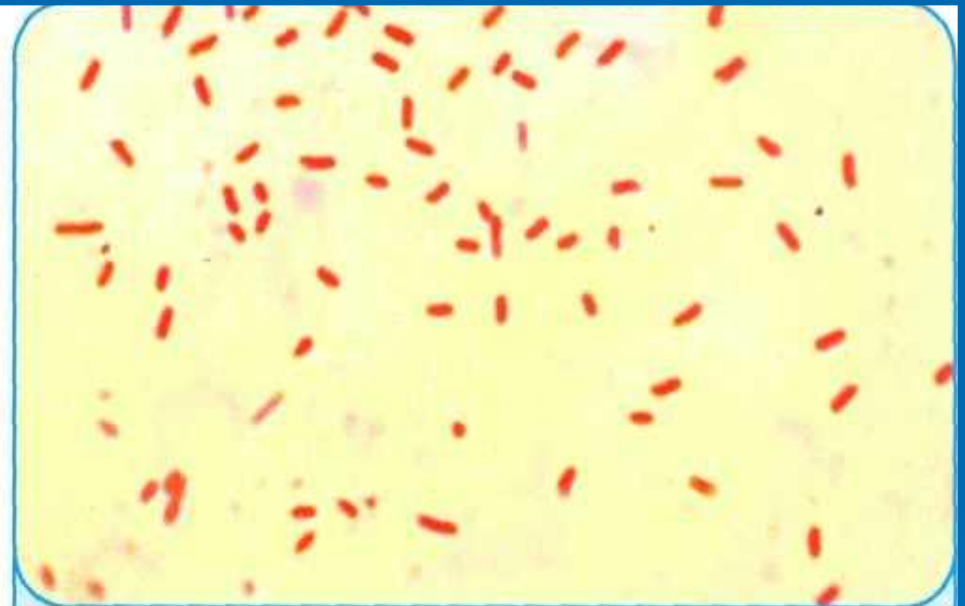


Рис. 3.51. Мазок из чистой культуры *S. flexneri*. Окраска по Граму

Шигеллы — прямые грамотрицательные палочки с закругленными концами (0,7–1,0 x 1–3 мкм). Неподвижны (не имеют жгутиков). Факультативные анаэробы. По O-антигенам выделяют 45 сероваров внутри видов *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii*. У некоторых шигелл обнаруживают K-антиген. Вирулентность связана с плазмидой инвазии, которая имеется у всех шигелл. Плазмида детерминирует синтез Ipa BCD-инвазинов (invasion plasmide antigen) — белков, входящих в состав наружной мембраны

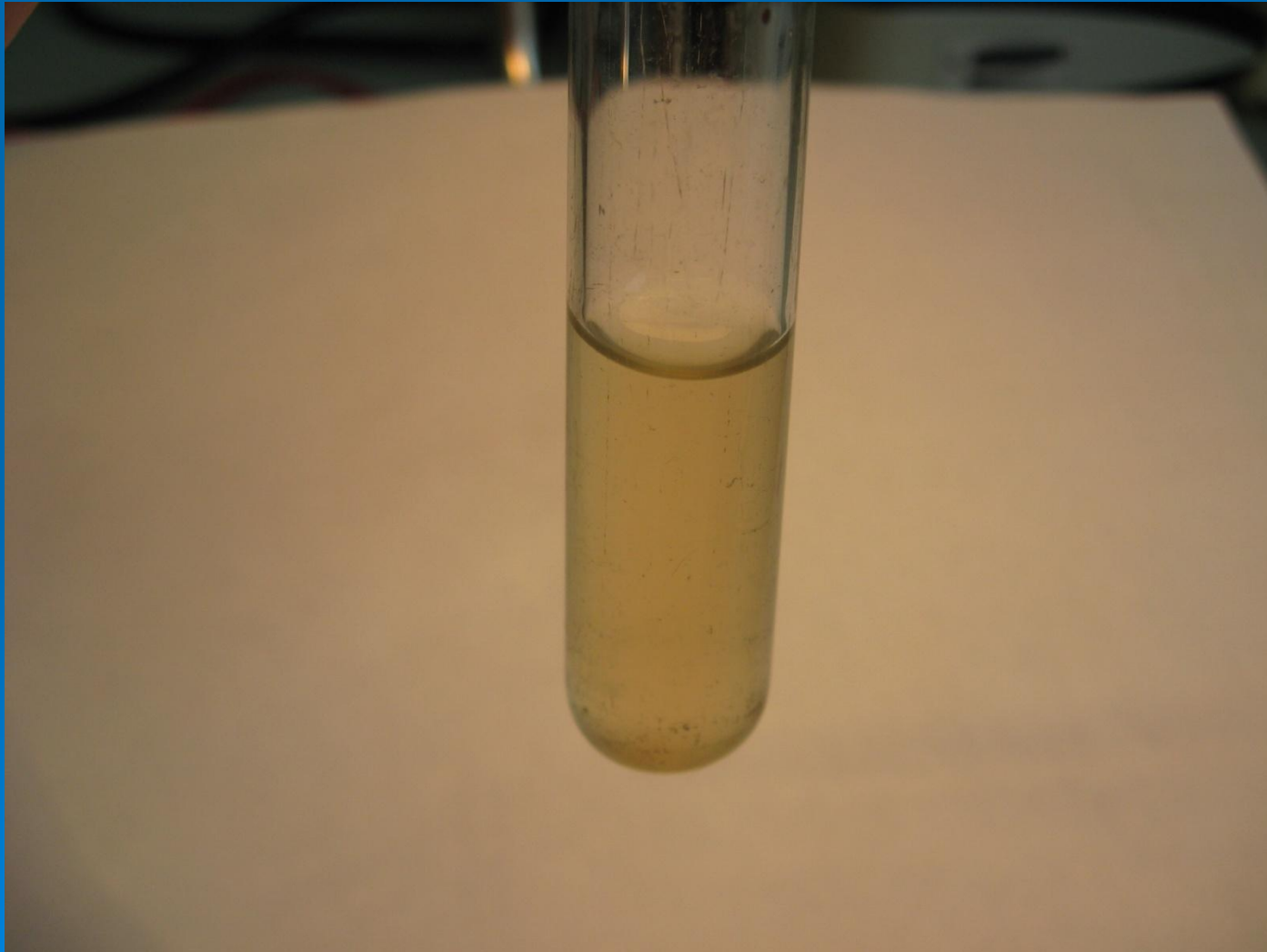


Рис. 3.52. Мазок из чистой культуры *S. flexneri*. РИФ

- При росте в бульоне гладкие S-формы образуют равномерное помутнение, шероховатые R-формы - придонный осадок, иногда пленку на поверхности среды.



Рост шигелл Флекснера в бульоне



На агаре шигеллы в S-форме образуют небольшие колонии до 1 – 1,5 мм в диаметре, круглые, слегка выпуклые с ровными краями, бесцветные блестящие полупрозрачные мягкой консистенции. Культуры могут быть одновременно в S-, R- и переходной формах.

***S. flexneri* и *S. dysenteriae* образуют более мелкие и нежные колонии.**



Колонии *S. flexneri* на среде Плоскирева

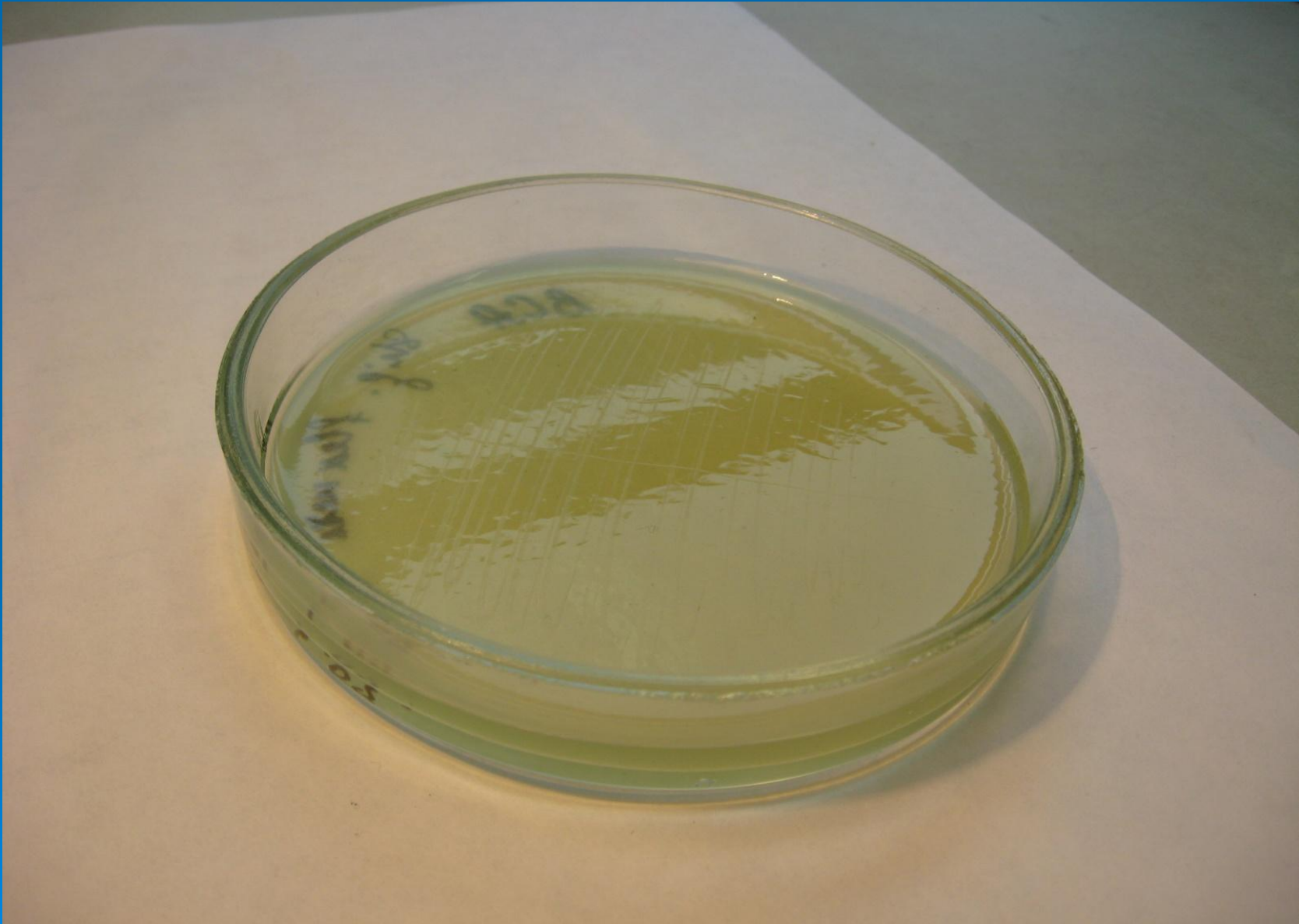


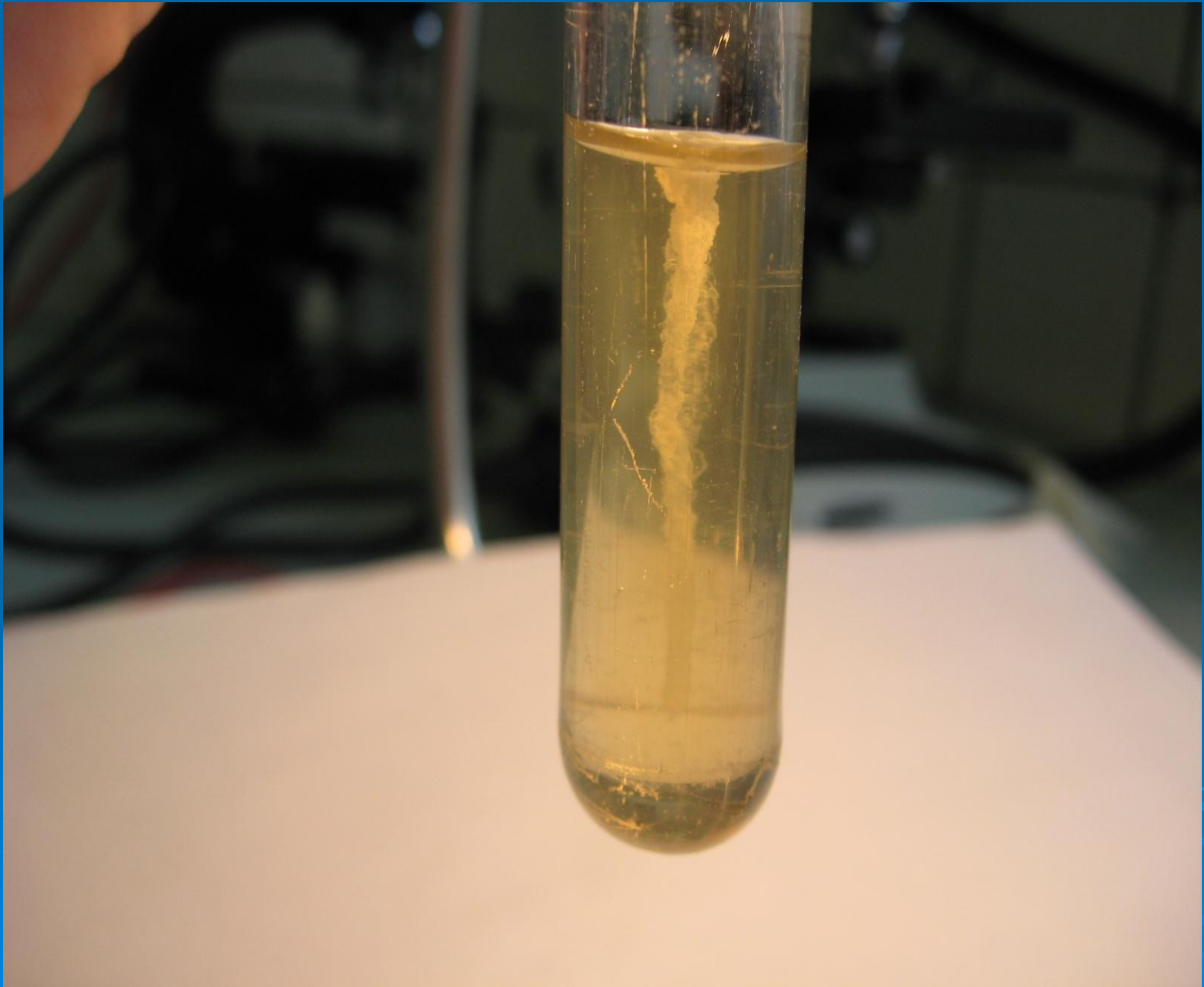
Ш. Зонне образуют два типа колоний:

- небольшие выпуклые колонии правильной округлой формы – **1-я фаза**;
- крупные плоские колонии с неровными краями, напоминающие виноградный лист – **2-я фаза**.
- Возможны промежуточные формы.



Шигеллы не растут на ВСА

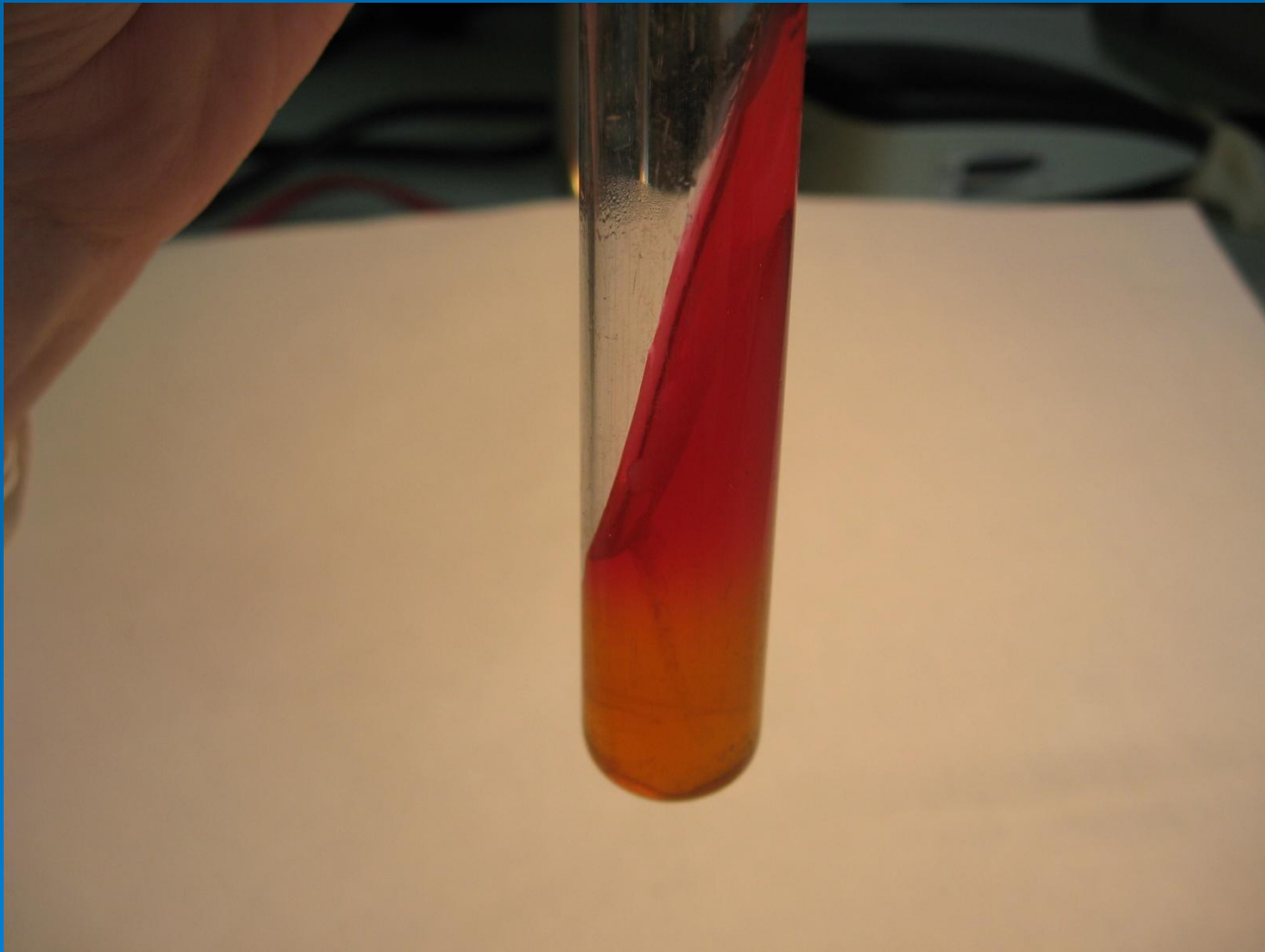




Биохимические свойства

- Шигеллы биохимически мало активны.
- Разлагают глюкозу до кислоты без газа, маннит (кроме ***S. dysenteriae***), дают положительную реакцию с метиловым красным; индол образуютvariably.
- Не продуцируют сероводород на среде Клиггера, не ферментируют лактозу (кроме шигелл Зонне-замедленно), сахарозу, желатин, адонит и инозит, не гидролизуют мочевины, малонат натрия, цитрат в среде Симмонса, не ферментируют фенилаланин и лизин.

Рост шигелл на среде Клиггера



Антигенное строение

- Имеют **2 О-Аг** (типовой и групповой) – термостабильны, по строению - ЛПС-белковый комплекс; белок обуславливает иммуногенность, ЛПС – серологическую специфичность.
- **К-Аг** – поверхностный, термолабильный. Способен маскировать агглютинацию шигелл О-сыворотками. Разрушается при кипячении культуры при 100° С в течение часа.
- Серологическая идентификация шигелл проводится при использовании О - антисывороток.

Схема серологической идентификации шигелл

- 1. Ставится ОРА (слайд-агглютинация) с поливалентной антисывороткой к *S. flexneri* – *S. sonnei*. В «+» случае разворачивается ОРА с каждой сывороткой в отдельности (с поливалентной сывороткой к *S. flexneri* и с сывороткой к *S. sonnei*).
- При наличии агглютинации культуры с поливалентной сывороткой к *S. flexneri* ставится РА с типовыми сыворотками к *S. flexneri* (с I по VI) – определяют серовар и затем с групповыми (3,4; 6; 7,8) – подсеровар.

- В случае отрицательного результата с поливалентной сывороткой к *S. flexneri* ставится ОРА с сывороткой к *S. Sonnei* к I и II-й фазам.
- 2. Маннит «+» штаммы шигелл, не агглютинирующиеся поливал. сывороткой к *S. flexneri* – *S. sonnei* испытывают с поливалентной сывороткой к *S. boydii*; при «+» ОРА проводится расшифровка с моносыворотками к *S. boydii* (1-15).

□

- 3. Маннит «-» штаммы шигелл агглютинируют с поливалентной сывороткой к *S. dysenteriae*, при наличии агглютинации реакцию развертывают с моновалентными сыворотками к *S. dysenteriae* (1 – 16).

Серологические методы диагностики:

□ РНГА

□ Экспресс-методы - выявление Аг шигелл
в испражнениях:
РКОА, РЛА, РНГА, ИФА

Факторы патогенности

- Шигеллы способны к **инвазии** в клетки эпителия слизистой оболочки тонкой кишки, к переходу в соседние клетки, внедрению в цитоплазму нейтрофилов и макрофагов.
- *S. dysenteriae* 1 продуцируют **экзотоксин (токсин Шига)** – вызывает гибель клеток эпителия кишечника и приток жидкости в очаг поражения, нарушает синтез белка, всасывание натрия и воды.
- **Эндотоксин** – воздействует на сосудистую и нервные системы организма, образуя геморрагии и тромбозы, понижает АД, нарушает активность макрофагов.

Чувствительность к АБ

Препараты выбора – ампициллин, ко-тримоксазол, ципрофлоксацин и др. с учетом чувствительности к АБ шигелл.

Наиболее часто шигеллы устойчивы к тетрациклинам, левомицетину, стрептомицину.

При терапии дизентерии назначают **эубиотики**: бифидумбактерин, бификол, колибактерин, лактобактерин. Полезно определение формы и степени дисбактериоза по соотношению микробов естественной флоры кишечника.

Назначаются симптоматические средства и восполняются потери жидкости и электролитов.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БИОХИМИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПОЛУАВТОМАТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ API (API 20E)



ЭТАПЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРИ ОКЗ

1 ДЕНЬ

- Подготовка материала к исследованию;
- Бактериоскопия исследуемого материала (при анализе материала из стерильных полостей и гноя);
- Посев в **среды обогащения**:
- кровь, желчь, спинномозговой ликвор («чистый» материал) – в желчный бульон, среду Рапопорт, двойную среду

-материал, контаминированный посторонней микрофлорой – в селенитовый бульон, среды магниевую, Килиана, Кауфмана.

-Посев на плотные элективныe и селективныe среды – **Эндо, Левина, Плоскирева, ВСА.**

Инкубация при 37 °С 24 часа, на ВСА – 48 часов.

2-Й ДЕНЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Просмотр посевов нативного материала на плотных и жидких средах;
- Отбор подозрительных лактозо «-» колоний, приготовление мазков по Граму, просмотр;
- Пересев культур из них на ПУС для изучения биохимической активности, сектора среды Эндо или косяки МПА для накопления чистой культуры;

- Высев из сред обогащения на плотные среды, приготовление мазка с окраской по Граму;
- Изучение подвижности выделенной культуры методом висячей или раздавленной капли или посевом в 0,3% питательный агар рН 7,4;
- Посев в питательный бульон рН 7,4 + индикаторные полоски для выявления индола и сероводорода;
- Посев в среду Симмонса;
- Постановка ОРА с диагностической поливалентной эшерихиозной сывороткой ОКА.
Реакция начинается с **контроля культуры** (эмульгирования исследуемой культуры в физиолог. растворе) для исключения спонтанной РА.

3-Й ДЕНЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Первичное изучение биохимической активности выделенной культуры на ПУС, определение подвижности (учет тестов);
- Изучение АГ-го строения выделенной культуры с использованием диагностических поливалентных и монорецепторных сывороток к шигеллам, сальмонеллам, ЭПКП в ОРА;
- Подбор необходимого набора биохимических тестов для определения вида возбудителя и посев на дифференциально-диагностические среды.
- Постановка пробы на чувствительность к АБ-м методом дисков.

4-Й ДЕНЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Учет тестов, поставленных накануне;
- Выдача заключения о выделении культуры соответствующего рода и вида.