



Лабораторная диагностика кишечных инфекций: брюшного тифа, пищевых токсикоинфекций

Общая характеристика

Сальмонеллы (*Salmonella*)

Род назван в честь американского ветеринара Даниела Салмона

Сальмонелла - один из наиболее распространенных возбудителей пищевых токсикоинфекций

Инфицирует большинство видов сырых продуктов (мясо, яйца, растительные продукты)

Таксономия

Домен (царство): Procaryota

Отдел: Gracilicutes

Семейство:

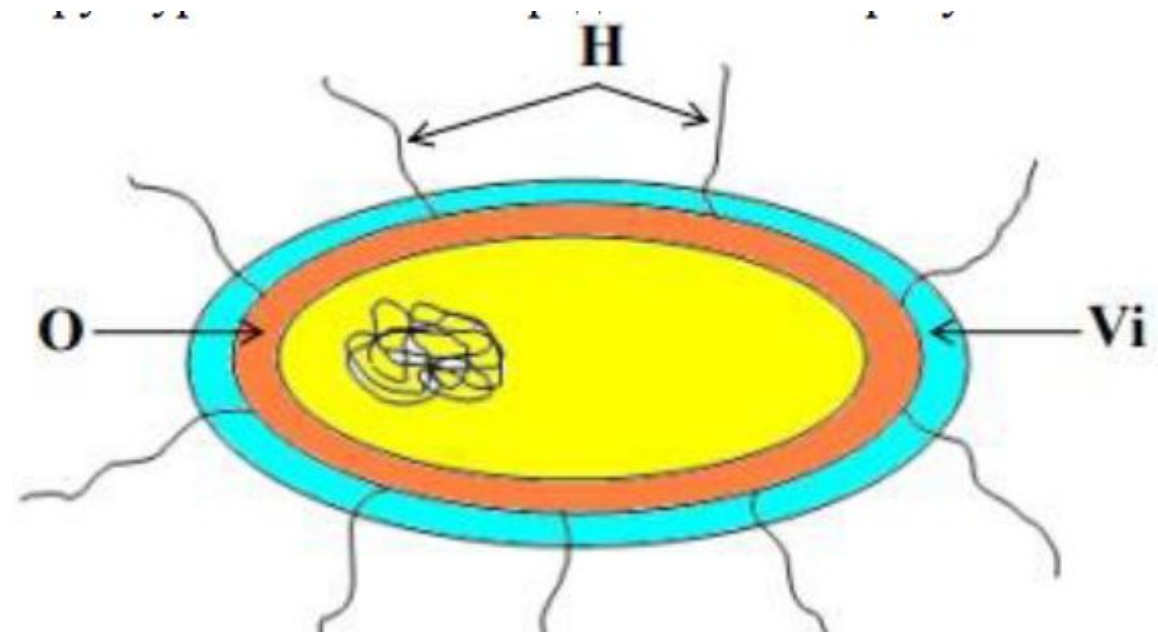
Enterobacteriaceae

Род: *Salmonella* СОСТОИТ ИЗ ДВУХ ВИДОВ:

- ***S. enterica*** (*S. enterica*; *S. salamae*, *S. arizonae* *S. diarizonae*)
- ***S. bongori***

В 1934 г. ученые-микробиологи Ф. Кауфман и П. Уайт предложили провести перераспределение штаммов сальмонелл согласно антигенной структуре

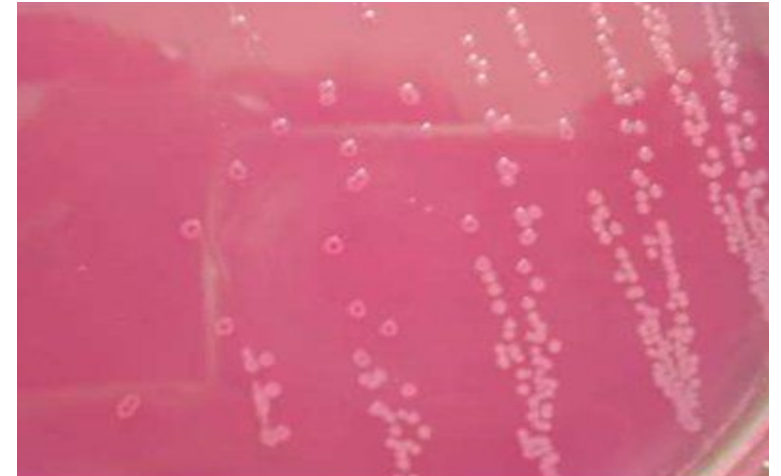
- Сальмонеллы подразделяются на серогруппы в соответствии со строением О-антигена.
- Каждая серогруппа обозначается буквами (А, В, С и т. д.) и подразделяется на подгруппы. Серогруппы сальмонелл делятся на видовые группы микроорганизмов по строению О антигена клеточной стенки (серовары, серотипы).
- По строению Н-антигена сальмонеллы распределены на две ступени или, по другому, фазы: 1 ступень (специфическая),



Vi-антиген – видовой антиген К-антигена сальмонелл, химическая структура которого представлена как мукополисахарид

Общая характеристика

- Палочковидные
- Грамотрицательные
- Спор не имеют
- Капсул не имеют
- Факультативные анаэробы
- Вырабатывают энтеротоксины и эндотоксины



Факторы патогенности сальмонелл

- Основными патогенными факторами являются
 - токсины,
 - пили,
 - Vi-антиген,
 - Белки наружной мембраны,
 - резистентность к фагоцитозу.
- Каждый вид или подвида сальмонеллы обладают разным набором токсинов.
- При повреждении бактериальной клетки высвобождается эндотоксин, который в случае бактериемии способствует развитию лихорадки.

Характер роста на питательных средах

- Культивируются на простых питательных средах
- На дифференциально-диагностических средах образуют прозрачные колонии (редуцируют лактозу)
- На висмутсульфитном агаре образуют колонии черного цвета
- На МПА гладкие полупрозрачные колонии S типа
- На МПБ помутнение среды
- Температурный оптимум для роста – 35-37°C, рост полностью прекращается при 5°C; оптимум pH=7,2-7,4.

Биохимические свойства:

- ферментация глюкозы до кислоты и газа (S. Typhi не продуцируют газ);
- отсутствие ферментации лактозы;
- отсутствие индолообразования;
- отсутствие расщепления мочевины

Резистентность

- Сальмонеллы устойчивы к воздействию факторов внешней среды.
- Выдерживают рН 4,0–9,0; в водоемах, сточных водах, почве сохраняют жизнеспособность до 3 мес, в комнатной пыли — от 80 до 550 дней. Хорошо переносят низкие температуры.
- Сохраняются в зараженных продуктах: в колбасе — 3 мес, замороженном мясе и яйцах — до 1 года, на овощах и фруктах — 5–10 дней.
- При нагревании до 56 °С сальмонеллы гибнут в течение 45–60 мин, при температуре 100 °С погибают мгновенно. Растворы дезинфицирующих веществ (5% раствор фенола, 3% раствор хлорамина, 3% раствор лизола) убивают сальмонеллы в течение 2–3 мин.

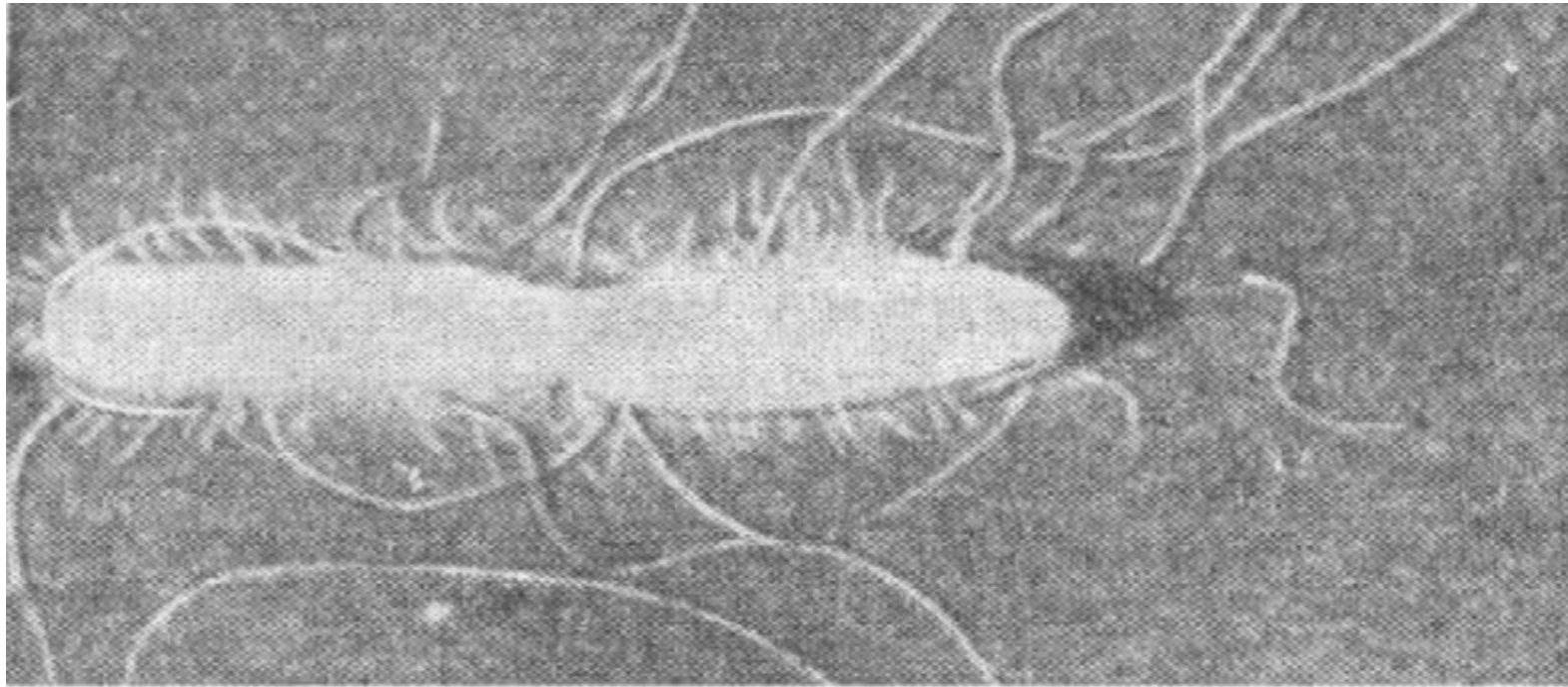
Вызываемые заболевания

- В зависимости от источника инфекции, путей передачи, особенностей патогенеза и форм проявления инфекционного процесса среди заболеваний, вызываемых сальмонеллами, различают
- системные инфекции (брюшной тиф и паратифы)
- сальмонеллезные гастроэнтериты
- госпитальный (нозокомиальный) сальмонеллез

Сальмонеллы-возбудители пищевых токсикоинфекций. Сальмонеллезы

- Сальмонеллез характеризуется поражением тонкого кишечника и протекает в форме энтерита или в генерализованной форме, возникающие в результате употребления пищевых продуктов, зараженных различными видами сальмонелл (*S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Choleraesuis*, *S. Dublin* и другие, входящие в серогруппы В, С, D и Е. Заражающая доза для человека составляет 1-100 млн микробных клеток
- Морфология и тинкториальные свойства. Палочки с закругленными концами длиной 1—3 мкм. Большинство из них, благодаря перитрихально расположенным жгутикам, подвижны. По Граму окрашиваются отрицательно.
- Культуральные свойства. Возбудители пищевых токсикоинфекций — факультативные анаэробы. Оптимальная температура для размножения 35—37 °С. Могут расти при значении рН 4,1—9.

Электроннограмма сальмонеллы
(Инфекционные болезни. Атлас:
руководство. Учайкин В.Ф., Харламова Ф.С.,
Шамшева О.В., Полеско И.В. 2010.)



Сальмонеллы-возбудители пищевых токсикоинфекций

- **Антигенная структура.**

- Сальмонеллы — возбудители пищевых токсикоинфекций, обладают тремя основными антигенными комплексами: О-соматическим, Н-жгутиковым и К-капсульным.

- **Резистентность.**

- В окружающей среде и в пищевых продуктах сальмонеллы долго сохраняют жизнеспособность. Хорошо и длительно переносят низкие температуры, при температуре же выше 46 °С быстро, а при 100 °С мгновенно погибают.

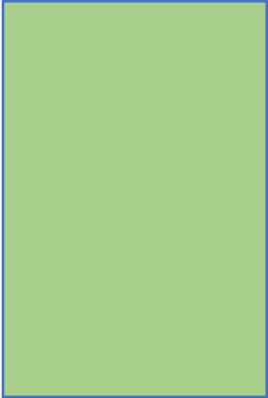
Сальмонеллы-возбудители пищевых токсикоинфекций

- **Эпидемиология.**
- Основным источником инфекции являются сельскохозяйственные животные и птицы — больные сальмонеллезом или бессимптомные носители.
- **Основной путь заражения — алиментарный**, а факторы передачи инфекции — различные пищевые продукты (мясо животных, яйца и яичные продукты, молоко). Одной из важных проблем современной медицины становится сальмонеллез как «внутрибольничная» инфекция. Источником ее в этом случае является человек

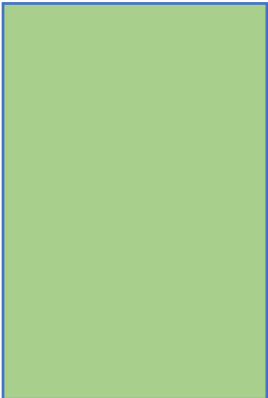
Сальмонеллы-возбудители пищевых токсикоинфекций. Факторы патогенности

- Экзотоксины- энтеротоксин (entero - кишка) и цитотоксин, которые специфически действуют на эпителий кишечника.
- Механизм действия энтеротоксина заключается в том, что эти вещества связываются со специфическими рецепторами мембраны эпителия. Связанный токсин активирует мембранную аденилатциклазу, это вызывает повышение концентрации в клетке циклического аденозинмонофосфата (АМФ), что в свою очередь вызывает повышение скорости переноса электролитов, т.е. утечку воды из тканевых структур.
- Цитотоксин, продуцируемый сальмонеллами, термолабилен, его цитотоксическое действие проявляется в угнетении синтеза белка энтероцитами.
- Эндотоксины-факторы патогенности, по своей химической природе это комплекс липополисахаридов с белками клеточных стенок грамотрицательных бактерий, они идентичны O -антигенам (соматическим антигеном) целой клетки. Они вызывают повышение температуры тела (пирогенность) и являются

ЭНДО И ЭКЗОТОКСИНЫ



Экзотоксины- вещества, выделяемые при жизни бактерий.



Эндотоксины образуются в результате разрушения бактериальной клетки и представляют собой ее структуру.

Патогенез сальмонеллёза

Проникновение сальмонелл per os



Попадание в тонкий кишечник



Адгезия к энтероцитам, колонизация, выделение **токсинов** (эндо и экзо), трансцитоз в подслизистый слой, захват макрофагами



Цитотоксины



Гибель клеток, слущивание эпителия



Умеренное воспаление слизистой кишки



Энтеротоксин



Активация аденилатциклазы



Выход ионов и воды в просвет кишечника



Диарея

Иммунитет при сальмонеллезах

- Иммунитет при сальмонеллезах непродолжительный, ненапряженный, серовароспецифический.
- Возможны повторные заболевания, а также формирование длительного бактерионосительства

Лабораторная диагностика

- Диагностика проводится двумя методами: **бактериологическим и серологическим.**
- Для бактериологического исследования у пациента проводится забор крови на гемокультуру на 1 неделе заболевания, желчь, моча и желудочные испражнения (рвотная масса). На 2 неделе заболевания для бактериологического анализа также могут браться посеvy кала, моча.
- Серологическое исследование проводится на основе забора крови из вены (реакция Видаля, РНГА, ИФА) с 8-9 дня болезни. Данный вид исследования проводится всегда в динамике, с интервалом в 7-10 дней.

Брюшной тиф

- Брюшной тиф — острое антропонозное инфекционное заболевание с фекально-оральным механизмом передачи. Протекает в генерализованной форме с поражением лимфатического аппарата кишечника, мезентериальных лимфатических узлов, паренхиматозных органов, с бактериемией.
- Характеризуется циклическим течением.
- Клинически проявляется выраженной интоксикацией с лихорадкой, развитием гепатолиенального синдрома, в ряде случаев розеолезной сыпью и энтеритом.
- Название болезни введено Гиппократом, оно происходит от греческого слова typhos — «туман, спутанное сознание»

Брюшной тиф

Классификация возбудителя

- По определителю Берджи 5 группа – факультативно-анаэробные грамотрицательные палочки.
- Семейство Enterobacteriaceae
- Род Salmonella
- Вид *S. enterica*
- Подвид *enterica*, серовар *S. Typhi* (группа D9) – возбудитель брюшного тифа, серовар *S. Paratyphi A* (группа A2) – возбудитель паратифа А, серовар *S. Paratyphi B* (группа B2) – возбудитель паратифа Б.
- Антигены O, Vi, H

Этиология

- **Возбудителем брюшного тифа служит *S. Typhi*.**
- Впервые возбудитель заболевания обнаружили в органах умерших людей Т. Брович (1874), Н.И. Соколов (1876) в России и К. Эберт (1880) в Германии. В 1884 г. Т. Гаффки выделил возбудителя в чистой культуре.
- **Возбудителями паратифов служат *S. Paratyphi A*, *S. Paratyphi B*, *S. Paratyphi C*.**
- По данным ВОЗ, ежегодно на земном шаре заболевают брюшным тифом 27 млн человек, смертность от него достигает 21 млн случаев в год. Возбудителей паратифа *S. Paratyphi A*, *B*, *S. Sendai C* выделяют реже, чем *S. Typhi*.

Характеристика возбудителей

- Палочки
- Подвижные, перетрихи
- Спор нет
- Капсул нет
- Есть пили (адгезины)
- Способны образовывать L формы при неблагоприятных условиях



Ферментативные свойства

- Разлагают глюкозу, мальтозу, маннит с образованием кислоты
- Не ферментируют лактозу и сахарозу
- Не разжижают желатину
- Образуют сероводород
- Восстанавливают нитраты в нитриты

Биохимическая активность и культуральные свойства



Факторы патогенности

Факторы адгезии и колонизации-ЛПС, пили

Энтеротоксин (экзотоксин). Эндотоксин, высвобождается при гибели бактерий

Факторы агрессии- ферменты патогенности

- ДНК-азы,
- фосфатазы,
- протеазы,
- муциназы,
- гемолизины

Эпидемиология

- Брюшной тиф -антропонозы
- Источником инфекции служит больной или бактерионоситель, которые выделяют возбудитель во внешнюю среду с испражнениями, мочой, слюной
- Возбудители устойчивы во внешней среде, сохраняются в почве, воде продуктах
- Передача возбудителя осуществляется водным, алиментарным и контактно-бытовыми путями. Естественная восприимчивость людей к этим инфекциям высокая

Брюшной тиф

- Вызывается *Salmonella typhi*
- Проявляется симптомами общей интоксикации. Температура тела достигает 39-40°C к 4-7 суткам. На 3-5-е сутки увеличиваются печень и селезенка. В период разгара болезни (на 7-8-е сутки) симптомы интоксикации усиливаются, что проявляется резкой заторможенностью, помрачением сознания, характерна сыпь. Живот вздут, выражены симптомы энтерита.
- **Экзотоксины:** LT-токсин-увеличивает содержание цАМФ в энтероцитах, ST-токсин-нарушает синтез белков, активизирует образование простагландинов.
- **Эндотоксин** угнетает деятельность ЦНС, может вызвать миокардит, миокардиодистрофию и инфекционно-токсический шок.

Патогенез брюшного тифа

1. Внедрение возбудителей в организм
2. Развитие лимфаденита
3. Бактериемия
4. Интоксикация
5. Паренхиматозная диффузия возбудителей
6. Выделение возбудителей из организма
7. Формирование иммунитета
8. Восстановление гомеостаза организма

Патогенез

Заражение происходит через рот, и первичным местом локализации возбудителей оказывается пищеварительный тракт – дигестивная стадия. Заражение

Патогенез



Empty rounded rectangular box for text.

Empty rounded rectangular box for text.

Empty rounded rectangular box for text.

Патогенез

Одновременно происходят стимуляция фагоцитоза, синтез антител, специфическая сенсibilизация организма, возрастает выделение возбудителя в окружающую среду через желчь и мочевыделительную систему

Повторное проникновение возбудителя из печени с током желчи в кишечник вызывает местную анафилактическую реакцию в виде некроза лимфоидных образований – выделительно-аллергическая стадия. В кишечнике происходит отторжение некротических масс. На третьей неделе отмечают тенденцию к снижению интенсивности бактериемии.

Патогенез

Причина бактерионосительства - возбудитель может сохраняться в клетках системы моноцитарных фагоцитов, что может приводить к хроническому бактерионосительству, которое при брюшном тифе рассматривают как форму инфекционного процесса.

Лабораторная диагностика. Методы диагностики:

Исследуемый материал: зависит от стадии болезни: на 1 – 2 неделе заболевания – кровь (ранняя диагностика), со 2 – 3 недели – испражнения, моча, желчь (поздняя диагностика).

1. Экспресс-метод-ПЦР

2. Бактериологический метод (основной)

А) Исследование крови (выделение гемокультуры):

- Кровь засевают в желчный бульон или среду Раппопорт в соотношении 1:10. Затем пересевают на дифференциально-диагностические питательные среды Эндо, Левина, Плоскирева, висмут-сульфит агар.
- Колонии сальмонелл на средах Эндо, Левина, Плоскирева мелкие, округлые, с ровным краем, блестящей поверхностью, прозрачные, бесцветные, т.к. сальмонеллы не расщепляют лактозу (лактозонегативные).
- На висмут-сульфит агаре *S.Typhi* формируют черные колонии с характерным металлическим блеском.
- Из колоний: делают мазок с окраской по Граму (определяют морфотинкториальные свойства), определяют подвижность (подвижны).

Лабораторная диагностика. Методы диагностики:

- Б) **Исследование испражнений (выделение копрокультуры):**
- Испражнения засевают на среды накопления (селенитовый бульон, среда Мюллера), затем пересевают на дифференциально-диагностические питательные среды Эндо, Левина, Плоскирева, висмут-сульфит агар.
- Последующие этапы бактериологического метода проводятся аналогично разобранным выше.
- В) **Исследование мочи (выделение уринокультуры) и желчи (выделение биликультуры):**
- Мочу и желчь засевают на дифференциально-диагностические питательные среды Эндо, Левина, Плоскирева, висмут-сульфит агар.

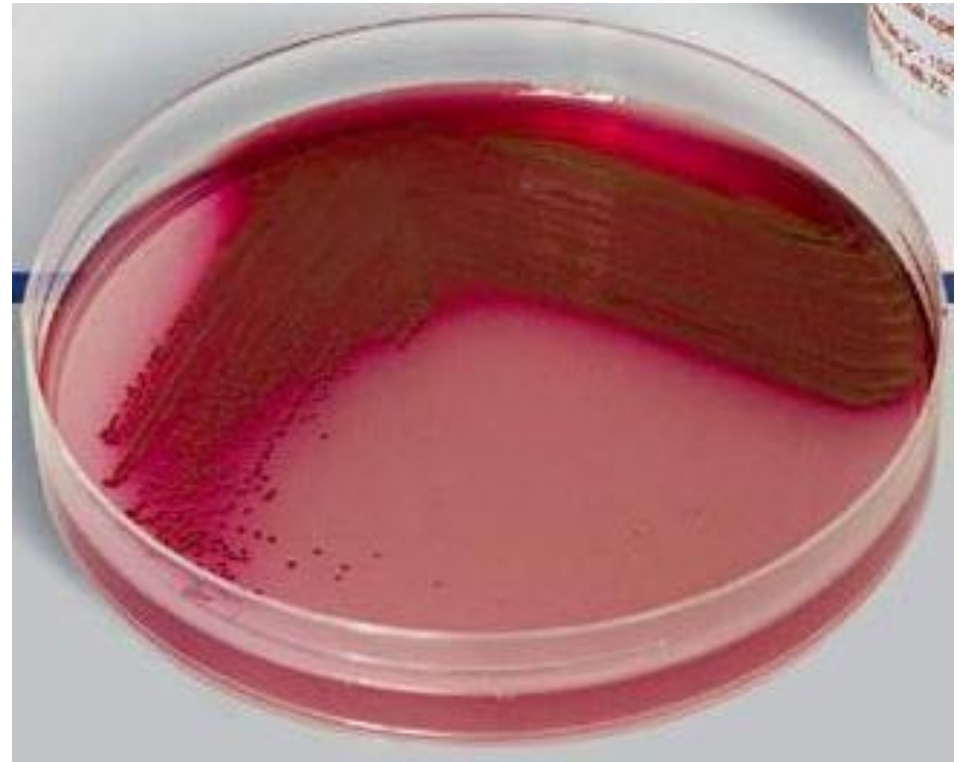
Среда Эндо

Состав:

- питательный агар,
- лактоза,
- основной фуксин.

Среда имеет розовый оттенок.

Колонии бактерий, ферментирующих лактозу, окрашиваются в темно-красный цвет; колонии бактерий, не ферментирующих лактозу, остаются бесцветными.



Среда Левина

Состав:

- питательный агар,
- лактоза,
- эозин и метиленовый синий.

Среда имеет коричневатый оттенок.

Колонии бактерий, ферментирующих лактозу, окрашиваются в темно-синий цвет; колонии бактерий, не ферментирующих лактозу, остаются бесцветными



Среда Плоскирева

Состав:

- питательный агар,
- лактоза,
- нейтральный красный,
- соли желчных кислот, бриллиантовый зелёный.

Среда имеет розовато-желтоватый оттенок.

Колонии бактерий, ферментирующих лактозу, окрашиваются в бруснично-красный цвет;

колонии бактерий, не ферментирующих лактозу, остаются бесцветными.



Лабораторная диагностика

Идентифицируют чистую культуру по биохимическим свойствам:

Возбудитель							
	лактозы	глюкозы	мальтозы	сахарозы	маннита	индола	H ₂ S
S.Typhi	-	K	K	-	K	-	+

Лабораторная диагностика. Методы диагностики:

Серологический метод (серодиагностика)

- Используют РА Видаля и РНГА (РПГА).
- В реакции Видаля определяют титр АТ к О и Н АГ *S.Typhi*.
- Диагностический титр реакции 1:200. Высокие титры О-АТ наблюдаются только в период разгара болезни.
- Высокие титры Н-АТ наблюдаются в период реконвалесценции, а низкие титры могут оставаться долгое время после перенесённого заболевания; также выявляются у вакцинированных.

РНГА для обнаружения в крови обследуемых Vi-антител

РНГА для обнаружения в крови обследуемых Vi-антител. Для постановки испытуемую сыворотку разводят от 1/10 до 1/640, в качестве антигена используют эритроцитарный Vi-диагностикум (взвесь эритроцитов 1 группы крови человека, обработанных формалином и сенсibilизированных Vi-антигеном тифозной палочки).

РНГА с сывороткой больного с предполагаемым диагнозом брюшной тиф

Разведение сыворотки	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	K(+)	K(-)
Эритроцитарный O2 диагностикум								
Эритроцитарный O4 диагностикум								
Эритроцитарный O9 диагностикум								
Эритроцитарный Ha диагностикум								
Эритроцитарный Hb диагностикум								
Эритроцитарный Hd диагностикум								

В РНГА определяют титр АТ к Vi АГ S.Typhi.

Диагностический титр - 1:40. Высокие титры Vi-антител характерны для хронических брюшнотифозных бактерионосителей.

Фаготипирование



Фаготип Vi/D

- Определение фаготипов проводят с помощью специфических сальмонеллезных бактериофагов, которых к настоящему времени известно более 100.
- Установлено, что одни фаги лизируют сальмонеллы, содержащие O-антиген, другие (Vi-фаги) — только штаммы, содержащие Vi-антиген.
- Фаготипы сальмонелл стабильны.
- Метод фаготипирования сальмонелл используется в целях эпидемиологического анализа для выявления источника инфекции.

Напряженность иммунитета

Постинфекционный иммунитет при брюшном тифе и паратифах – гуморальный, напряженный, длительный (не менее 15-20 лет, часто пожизненный). Образуются антитела к О-, Н-, Vi-антигенам: Первыми к концу 1-й недели заболевания появляются антитела к О-АГ, достигая максимума к периоду разгара (14-15 дней), а затем исчезают. Антитела к Н-АГ появляются к концу 2-й недели, достигая максимума в период реконвалесценции и длительно сохраняясь в организме после перенесенного заболевания. Антитела к Vi-АГ обнаруживаются у бактерионосителей брюшного тифа. Постинфекционный иммунитет при сальмонеллезах – гуморальный и клеточный, типоспецифический, ненапряженный и недлительный, опосредован SIgA.

Специфическая профилактика и лечение

- Для специфической профилактики брюшного тифа по эпидемиологическим показаниям используют следующие вакцины: Вакцину брюшнотифозную спиртовую сухую, Вакцину брюшнотифозную Vi-полисахаридную Для поддержания иммунитета необходимы ревакцинации.
- Для экстренной профилактики лицам, которые проживают совместно с больным или которые употребляли продукты и воду, зараженные или подозрительно на заражение *S. Typhi*, назначают бактериофаг брюшнотифозный.
- Специфическое лечение- антибиотики широкого спектра действия
- Соблюдение санитарных и профилактических мер

Вакцина брюшнотифозная ви-полисахаридная жидкая (ВИАНВАК)

Раствор из капсульного (Vi-Ag), извлеченного из супернатанта культуры *S.typhi*, очищенного

Ферментативными и физико-химическими методами. При производстве вакцины *S.Typhi* выращивают в жидкой питательной среде, затем микроорганизмы инактивируют формалином и отделяют от питательной среды.

Vi-полисахарид осаждают из культуральной среды с помощью гексадецилтриметиламмония бромида.

Vi-полисахарид



Бактериофаг сальмонеллезный групп А, В, С, D, Е

- Стерильный очищенный фильтрат фаголизатов наиболее распространенных сальмонелл (активность по Аппельману) гр. А - *Salmonella paratyphi A*; гр. В - *S. paratyphi B*, *S. heidelberg*; гр. С - *S. newport*, *S. choleraesuis*, *S. oranienburg*, *S. infantis*; гр. D - *S. dublin*, *S. enteritidis*; гр. Е - *S. anatum*, *S. newlands* - не менее 10⁴; сальмонелл гр. В - *S. typhimurium* - не менее 10⁵ - до 1 мл.
- Препарат вызывает специфический лизис сальмонелл серотипов: гр. А - *S. paratyphi A*; гр. В - *S. paratyphi B*, *S. typhimurium*, *S. heidelberg*; гр. С - *S. newport*, *S. choleraesuis*, *S. oranienburg*, *S. infantis*; гр. D - *S. dublin*, *S. enteritidis*; гр. Е - *S. anatum*, *S. newlands*.
- Лечение и профилактика заболеваний и бактерионосительства, вызванных сальмонеллами: гр. А – *S. paratyphi A*; гр. В - *S. paratyphi B*, *S. typhimurium*, *S. heidelberg*; гр. С - *S. newport*, *S. choleraesuis*, *S. oranienburg*, *S. infantis*; гр. D - *S. dublin*, *S. enteritidis*; гр. Е - *S. anatum*, *S. newlands*.



- Для лечения бактериофаг принимают 3 раза в день через рот за 1 час до приема пищи с первого дня заболевания в течение 7-10 суток. При заболевании, характеризующемся слабовыраженным колитическим синдромом, и в период реконвалесценции одновременно с пероральным применением рекомендуется вводить препарат ректально, в виде клизм, вместо 1 приема через рот.
- В профилактических целях препарат рекомендуется применять для предупреждения бактерионосительства, внутрибольничной инфекции, во время групповых заболеваний в организованных коллективах и семьях. Оптимальные схемы использования - ежедневный прием разовой дозы в зависимости от возраста. Продолжительность приема препарата определяется условиями эпидситуации.



Эритроцитарный сальмонеллезный О-антигенный диагностикум

- Состоит из специфических антигенов сальмонелл сальмонелл серогрупп А, D C D E фиксированных на поверхности эритроцитов. Представляют собой 1 % взвесь формализированных эритроцитов барана, сенсibilизированных антигенами из сальмонелл в фосфатном буферном растворе
- Набор реагентов предназначен для выявления в сыворотке крови человека специфических антител к О-антигенам сальмонелл в реакции пассивной гемагглютинации (РПГА).
- При взаимодействии с сыворотками, содержащими антитела к сальмонеллам, наблюдается феномен агглютинации эритроцитов.



Сальмонеллезная адсорбированная O-сыворотка для реакции агглютинации



- Предназначен для идентификации с помощью реакции агглютинации (РА) на предметном стекле бактерий рода *Salmonella*, выделенных из биологического материала человека (моча, испражнения, промывные воды желудка, рвотные массы) с целью назначения правильного лечения больного.
- Адсорбированные сыворотки содержат антитела, которые агглютинируют культуры сальмонелл, содержащие гомологичные O-антигены, и не агглютинируют культуры сальмонелл, содержащие гетерологичные O-антигены.

Благодарю за внимание

Тема следующего занятия

Возбудители дизентерии и эшерихиозов