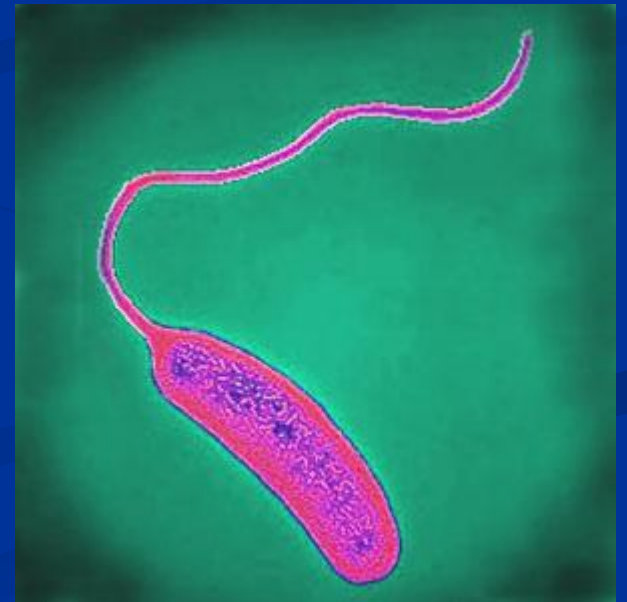


Патогенные вибрионы.

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



Таксономия

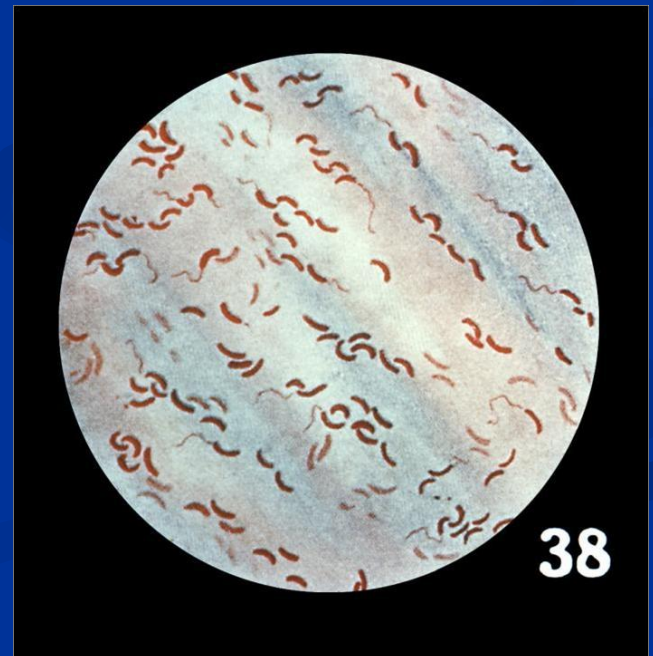
согласно таксономии Берги вибрионы входят в 5 группу- семейство *Vibrionaceae*.

К семейству относят 5 родов.

Медицинское значение имеют:

роды: ***Vibrio***, ***Aeromonas***,

Plesiomonas.



Род *Vibrio*

- прямые или изогнутые грамотрицательные палочки, не образующие спор;
- подвижны с помощью одного или многих полярно расположенных жгутиков;
- растут в аэробных и анаэробных условиях;
- продуцируют оксидазу (исключение *V. metschnikovii*);
- ферментируют глюкозу, некоторые с выделением газа.



Vibrio

1. Вид *Vibrio cholerae* (типовой вид рода)

а) *V. cholerae* O1 (два биовара - классический и эльтор)

б) *V. cholerae* O139

в) *V. cholerae* non O1 (от O2 до O200 серогруппы)

2. *V. metschnikovii*

3. *V. harveyi*

4. *V. campbellii*

5. *V. parahaemolyticus*

6. *V. alginolyticus*

7. *V. natriegens*

8. *V. vulnificus*

9. *V. nereis*

10. *V. fluvialis*

11. *V. furnissii*

12. *V. splendidus* I

V. splendidus II

13. *V. pelagius* I

V. pelagius II

14. *V. nigripulchritudo*

15. *V. anguillarum*

16. *V. ordalii*

17. *V. fischeri*

18. *V. logei*

19. *V. proteolyticus*

20. *V. gazogenes*

21. *V. marinus*

22. *V. costicola*

23. *V. mimicus*

24. *V. damsela*

25. *V. hollisae*

26. *V. aestuarianus*

27. *V. diazotrophicus*

28. *V. orientalis*

29. *V. cincinnatiensis*

30. *V. salmonicida*

31. *V. tubiashi*

32. *V. mediterranei*

33. *V. carchariae*

Vibrio cholerae

- V. cholerae открыл в 1854 году Пачини, он и дал название.
- Роберт Кох изучил и дал полное описание свойств классического вибриона.
- В 1906 году Ф.Готлиб на карантинной станции Эль-Тор (Синайский полуостров) выделил второго возбудителя холеры - вибриона Эль-Тор.

- На территории РФ в течении последних пяти лет имели место единичные завозные случаи холеры из республики Таджикистан, Индии, Китая.



Морфология

Вибрионы- изогнутая в виде запятой
грамотрицательная палочка размерами
1,5-4,0x0,2 мкм, монотрих- имеет полярный жгутик,
снабжённый чехликом. Хорошо окрашивается
анилиновыми красителями.

Могут образовывать L-формы.

Спор и капсул не образует.

Отличительной морфологической
особенностью вибриона O 139
является наличие капсулы.

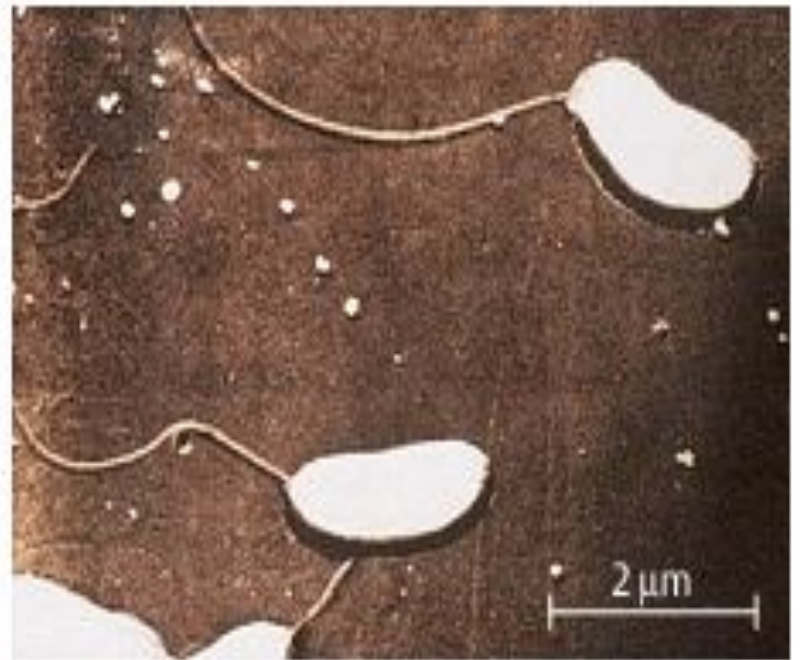


Рис. 3.56. Чистая культура *V. cholerae*. Окраска по Граму.



B

Vibrio cholerae



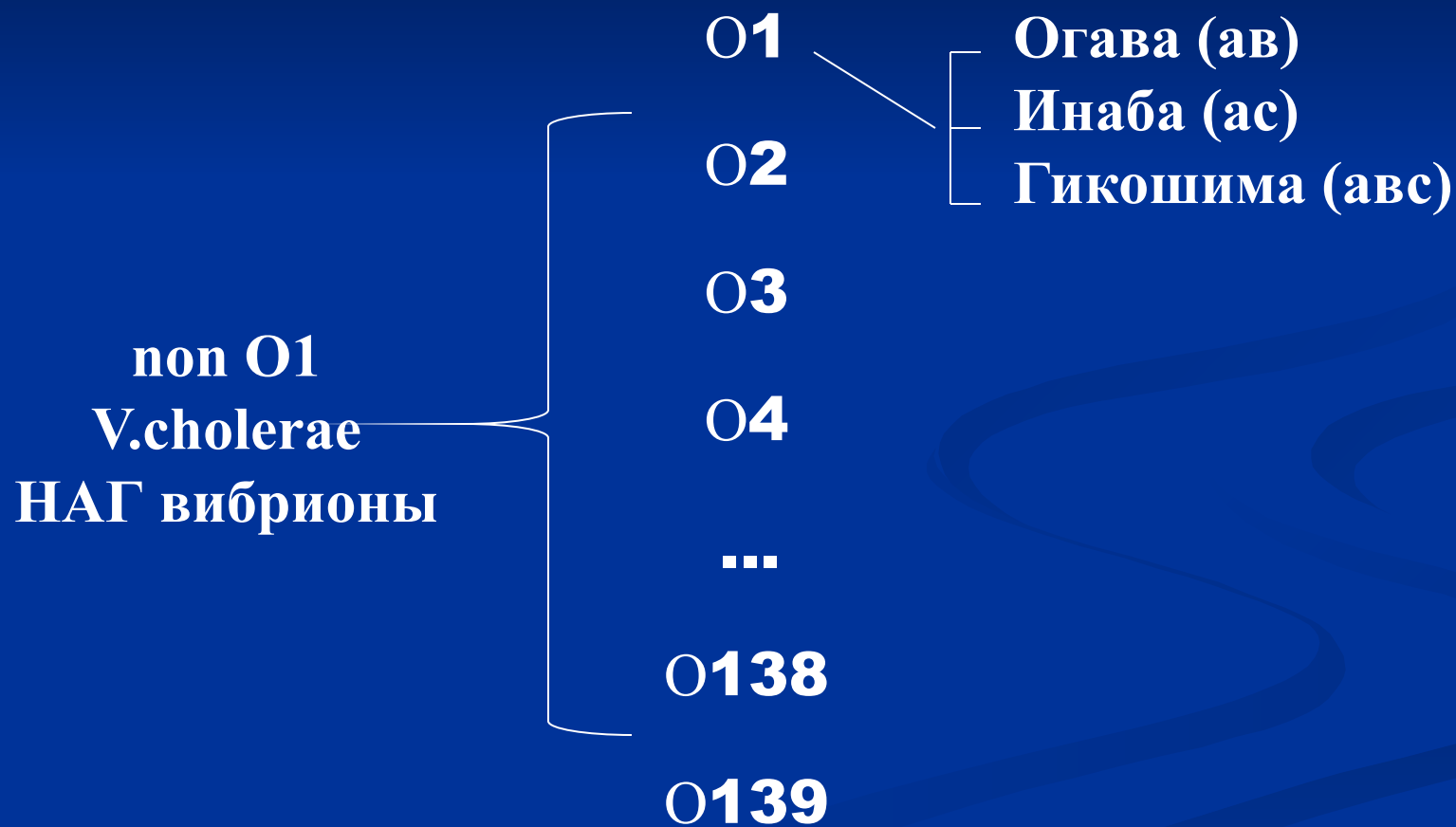
Антигенная структура

Холерные вибрионы имеют два основных антигена:

- O-антиген типоспецифический, термостабильный.
- H- жгутиковый, термолабильный



Подразделение *V.cholerae* по О-антигену



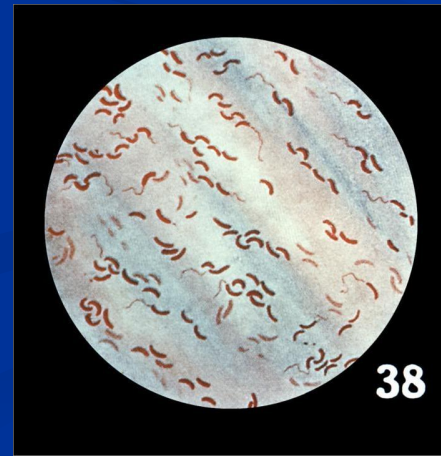
Резистентность

Возбудители холеры способны к сапрофитному способу существования в водной среде.

- При температуре 8°C размножение возбудителя холеры прекращается.
- При температуре 5°C возбудители холеры могут сохраняться до 4 лет.
- погибают при температуре 56°C - в течение 30 минут и мгновенно - при кипячении.
- Высушивание и действие солнечных лучей губительны для вибриона (погибают через несколько часов). В условиях достаточно высокой влажности, вибрионы сохраняются в течение 2-3 дней.



- Вибрион особо чувствителен к воздействию кислот, даже в самых слабых концентрациях.
- Дез.средства в невысоких концентрациях вызывают гибель холерных вибрионов в течение нескольких минут (хлорсодержащие препараты в концентрациях 0.2-0.3 мг/л).
- Губительно действуют на вибрион тетрациклин, нитрофураны.



Биовары *V.cholerae* O1

| | Классический | Эль-Тор |
|------------------------------------------|--------------|---------|
| Гемолиз эритроцитов барана | - | +* |
| Реакция Фогеса-Проскауэра | - | +(-) |
| Агглютинация куриных эритроцитов | - | +(-) |
| Чувствительность к полимиксину В (50 ЕД) | + | -(+) |
| классическому фагу IV | + | - |
| фагу Эль-ТорV | - (+) | +/- |

* выделяемые в последние годы штаммы не обладают гемолитической активностью. В МУ 4.2.1097-02 признак исключён



Воронкообразное
разжижение желатины
возбудителем холеры

Биохимическая активность

- По способности ферментировать арабинозу, маннозу, сахарозу вибрионы патогенных видов распределены по разным группам Хейберга

| | I | II | III | IV | V | VI | VII | VIII |
|-----------|---|----|-----|----|---|----|-----|------|
| Арабиноза | - | - | + | + | - | - | + | + |
| Манноза | + | - | + | - | + | - | + | - |
| Сахароза | + | + | + | + | - | - | - | - |

Культивирование холерных вибрионов

Необходима щелочная рН.

Транспортные среды:

- 1% пептонная вода с рН $8,5 \pm 0,1$
- 1% пептонная вода с рН $8,5 \pm 0,1$ с теллуридом калия
- 2% раствор поваренной соли

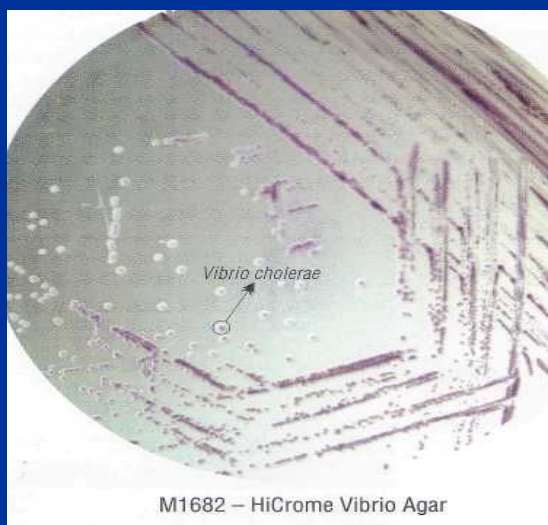


Элективные и элективно-дифференциальные среды для холерных вибрионов

| Среда | pH | Элективный фактор | Дифференциальный фактор | НТД |
|------------------------------------------------------------|---------|----------------------------------|------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| Щелочной МПА | 8,0±0,2 | | | МУ 4.2.1097-02 Инструкция 01-19/50-11 |
| СЭДХ | 8,8±0,2 | Препарат ПТ | Сахароза/ бромтимоловый синий | МУ 4.2.1097-02 Инструкция 01-19/50-11 |
| TCBS | 8,6±0,2 | Желчь | Сахароза/ бромтимоловый синий, тимоловый синий | МУ 4.2.1097-02 (с.15) Инструкция 01-19/50-11 |
| Среда Монсура | 7,6 | Желчь, теллурид калия | | Инструкция 01-19/50-11 |
| Щелочной агар с вторичными алкилсульфатами натрия | 7,8-8,2 | Моющее средство "Прогресс" | | Инструкция 01-19/50-11 |

Культуральные свойства

- **Щелочной агар** – круглые, гладкие, плоские, голубоватые, гомогенные с ровными краями, прозрачные в проходящем свете и светло-серые с голубоватым или зеленоватым оттенком в косом свете
- **TSBS и СЭДХ** – полупрозрачные, ярко желтые на зеленом или синем фоне среды
- **Атипичные колонии:** мутные с плотным центром, шероховатые, коричневые или желтые



TCBS – агар

Характер роста вибрионов на среде TCBS

| Организм | Цвет колоний % | | Интенсивность роста | Клиническая значимость |
|----------------------------|----------------|--------|---------------------|------------------------|
| | Зеленый | Желтый | | |
| <i>V. cholerae</i> | 0 | 100 | ++++ | ++++ |
| <i>V. mimicus</i> | 100 | 0 | ++++ | ++ |
| <i>V. metschnikovii</i> | 0 | 100 | ++ | +/- |
| <i>V. hollisae</i> | 100 | 0 | + | ++ |
| <i>V. damsela</i> | 95 | 5 | ++ при 36 °C | ++ |
| <i>V. fluvialis</i> | 0 | 100 | ++++ | ++ |
| <i>V. furnissii</i> | 0 | 100 | ++++ | ++ |
| <i>V. alginolyticus</i> | 0 | 100 | ++++ | ++ |
| <i>V. parahaemolyticus</i> | 99 | 1 | ++++ | ++++ |
| <i>V. vulnificus</i> | 90 | 10 | ++++ | +++ |
| <i>V. carchariae</i> | 0 | 100 | ++++ | +/- |
| <i>V. cincinnatiensis</i> | 0 | 100 | + | +/- |

| Признаки | V. cholerae | V. alginolyticus | V. cincinnatiensis | V. damsella | V. fluvialis | V. fumissii | V. harveyi | V. hollisae | V. metschnikovii | V. mimicus | V.paratyphicus | V. vulnificus |
|----------------------------------|-------------|------------------|--------------------|-------------|--------------|-------------|------------|-------------|------------------|------------|----------------|---------------|
| Морфология* Подвижность | + | + | + | d | d | + | - | +/- | d | + | + | + |
| Роение на агаре | - | + | - | - | - | - | d | - | - | - | d | - |
| Индофенолоксидаза | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + | + |
| Образование: | | | | | | | | | | | | |
| газа из глюкозы | | | | | | | | | | | | |
| индола | + | + | - | - | - | +(") | + | + | +(-) | + | + | + |
| ацетилметилкарбинола | +(") | + | +/- | + | - | - | d | - | + | - | - | - |
| Ферментация: | | | | | | | | | | | | |
| лактозы | - | - | - | - | - | - | - | - | +(") | "(+) | - | d |
| арабинозы | - | - | + | - | + | + | - | + | - | | +I- | - |
| сахарозы | + | + | + | - | + | + | d | - | + | - | - | - |
| целлобиозы | - | - | + | - | -(+) | -(+) | d | - | - | - | | + |
| маннита | + | + | - | - | + | + | d | - | + | + | + | +(") |
| салицина | - | - | + | - | +/- | - | - | - | - | - | - | + |
| Аргининдигидролаза | - | - | - | + | + | | - | - | -(+) | - | - | - |
| Лизиндекарбоксилаза | + | + | + | +(") | - | - | + | - | +(") | + | + | + |
| Орнитиндекарбоксилаза | + | d | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + |
| P-галактозидаза | + | - | +/- | - | d | d | - | - | d | + | - | d |
| Нитратредуктаза | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + | + |
| Амилаза | 4 | + | + | X | + | d | + | X | + | - | + | + |
| Желатиназа | d | + | - | - | +/- | d | - | - | d | d | + | d |
| Рост в 1% пептонной воде с NaCl: | 0% | + | - | - | "(+) | -(+) | - | - | -(+) | + | - | - |
| | 3% | + | + | + | + | + | + | | -(+) | + | + | + |
| | 6% | d | + | + | + | + | + | d | d | d | + | d |
| | 10% | - | + | - | - | -(+) | - | - | - | - | - | - |
| Рост при температуре: | | | | | | | | | | | | |
| 4 "C | - | - | - | - | - | - | - | X | - | - | - | - |

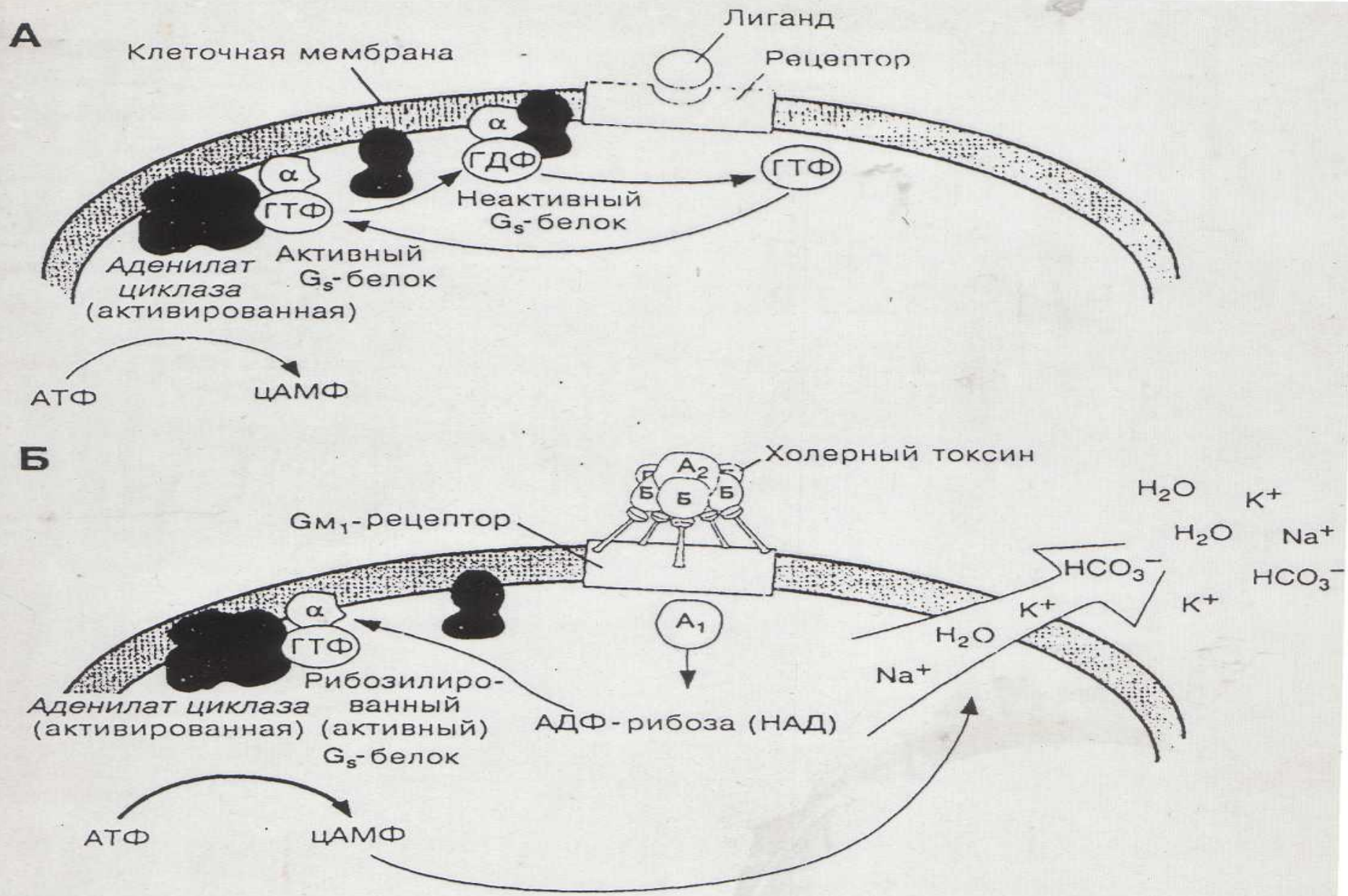
Факторы патогенности холерного вибриона

- **токсин-корегулируемые пили адгезии** – ген *tcp* на «острове патогенности» хромосомы
- **Холерный токсин (холероген)** – гены *ctxAB* (или *vctxAB*) в составе умеренного нитевидного фага.

- Экзотоксин- холероген- термолабильный белок. Инактивируется формалином. Состоит из 2-х субъединиц А и В.

Частица В (пять пептидов) определяет взаимодействие с эпителиальными клетками и Ag специфичность.

Частица А- активирует внутриклеточную аденилатциклазу, приводит к повышению ц-АМФ и выходу электролитов и жидкости из клеток.



Принципиальная схема действия холерного экзотоксина.

Факторы вирулентности V.cholerae

| Фактор вирулентности | Эффект |
|-----------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|
| Экзотоксин(холероген) | Нарушает водно-солевой обмен, действие, приводящее к гибели эпителия тонкой кишки |
| эндотоксин | Угнетение фагоцитоза, инфекционно-токсические проявления, понижение кровяного давления |
| Фибринолизин, гиалуронидаза | Ферменты агрессии |

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ТОКСИНЫ

- ZOT (zonula occludens toxin) и ACE (accessory cholera enterotoxin) токсины, цитотоксический комплекс RTX, цитототонический фактор Cef, термостабильный токсин ST, NMDCY токсин (non membrane damaging cytotoxin), шигаподобный токсин Shb, No7 токсин (novel toxin), cholix toxin.
- **Фактор проницаемости** – нарушает проницаемость капилляров и клеточных мембран кишечной стенки.
- **Факторы адгезии и колонизации** – белки наружной мембраны, фимбрии, не менее важным фактором вирулентности холерных вибрионов являются токсин-корегулируемые пили адгезии или TCR (от англ. - toxin-coregulated pilus) - ключевой фактор колонизации. За синтез пилей TCR отвечают гены tcrA-F, среди них ген tcrA - за биосинтез основной субъединицы пилей.

ФАКТОРЫ ПАТОГЕННОСТИ

- **Ферменты агрессии:**
 - **муциназа** – способствует разрушению муцина на эпителиальных клетках, что облегчает всасывание токсических продуктов и открывает доступ к рецептору энтероцитов - ганглиозиду GM1 ;
 - **нейраминидаза** – обеспечивает взаимодействие с микроворсинками;
 - **протеаза** – способствует разрушению белков;
 - **гемолизин *V.cholerae eltor*** – разрушает эритроциты;
 - **гемагглютинин *V.cholerae eltor*** – способствует агглютинации эритроцитов;
 - продуцируют **лецитиназу, триглицероллипазу.**
- **Высокая подвижность** – жгутик состоящий из белка флагеллина.

Этиопатогенез

Источник инфекции: больной или носитель

Пути передачи:

- Фекально-оральный
- Водный
- Контактной-бытовой

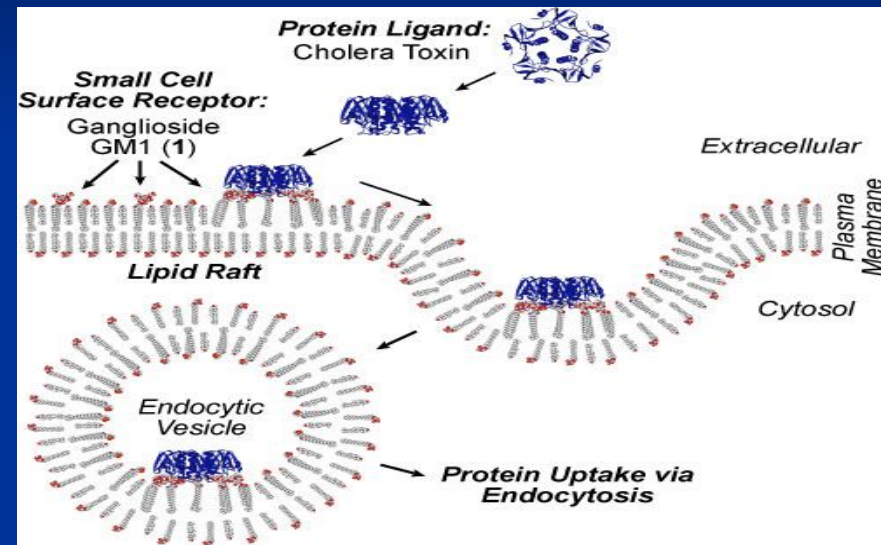


Инкубационный период от нескольких часов до 5 дней.

ПАТОГЕНЕЗ ХОЛЕРЫ

После адгезии и колонизации слизистой тонкого кишечника возбудитель остается на поверхности клеток, не вызывая воспаления (I тип взаимодействия).

Образование комплекса токсина с ганглиозидом GM1 запускает эндоцитоз. Дальнейшие события полностью определяются действием холерогена.



ПАТОГЕНЕЗ ХОЛЕРЫ

Потеря электролитов и воды приводит к обезвоживанию организма:

- Падает артериальное давление;
- Нарушается микроциркуляция;
- Развивается гипоксия тканей;
- Метаболический ацидоз;
- Гипокалиемия;
- Острая почечная недостаточность;
- Сердечная недостаточность;
- Возможен гиповолемический шок (алгид).

Формы заболевания

- Типичные: желудочно-кишечные
- Атипичные: молниеносная, сухая, стертая, бессимптомная,
- Вибрионосительство







Иммунитет

- Антимикробный, антитоксический
 - Относительно стойкий, видоспецифический
- С накоплением вибриоцидных АТ IgM и IgG.

Поствакцинальный иммунитет от 6 мес. до года.

Методы исследования:

- Бактериологический;
- Бактериоскопический;
- Серологический;
- Молекулярно-генетический.



Исследования, выполняются в лабораториях, имеющих разрешение на работу с микроорганизмами III гр. патогенности

- Исследование материала от больных, контактных из окружающей среды до установления отрицательного результата или выделения вибрионов.
- Идентификация вибрионов: мазок, оксидаза, рост на полиуглеводной среде, слайд-агглютинация с холерными сыворотками O1, Oгава, Инаба, PO, O 139

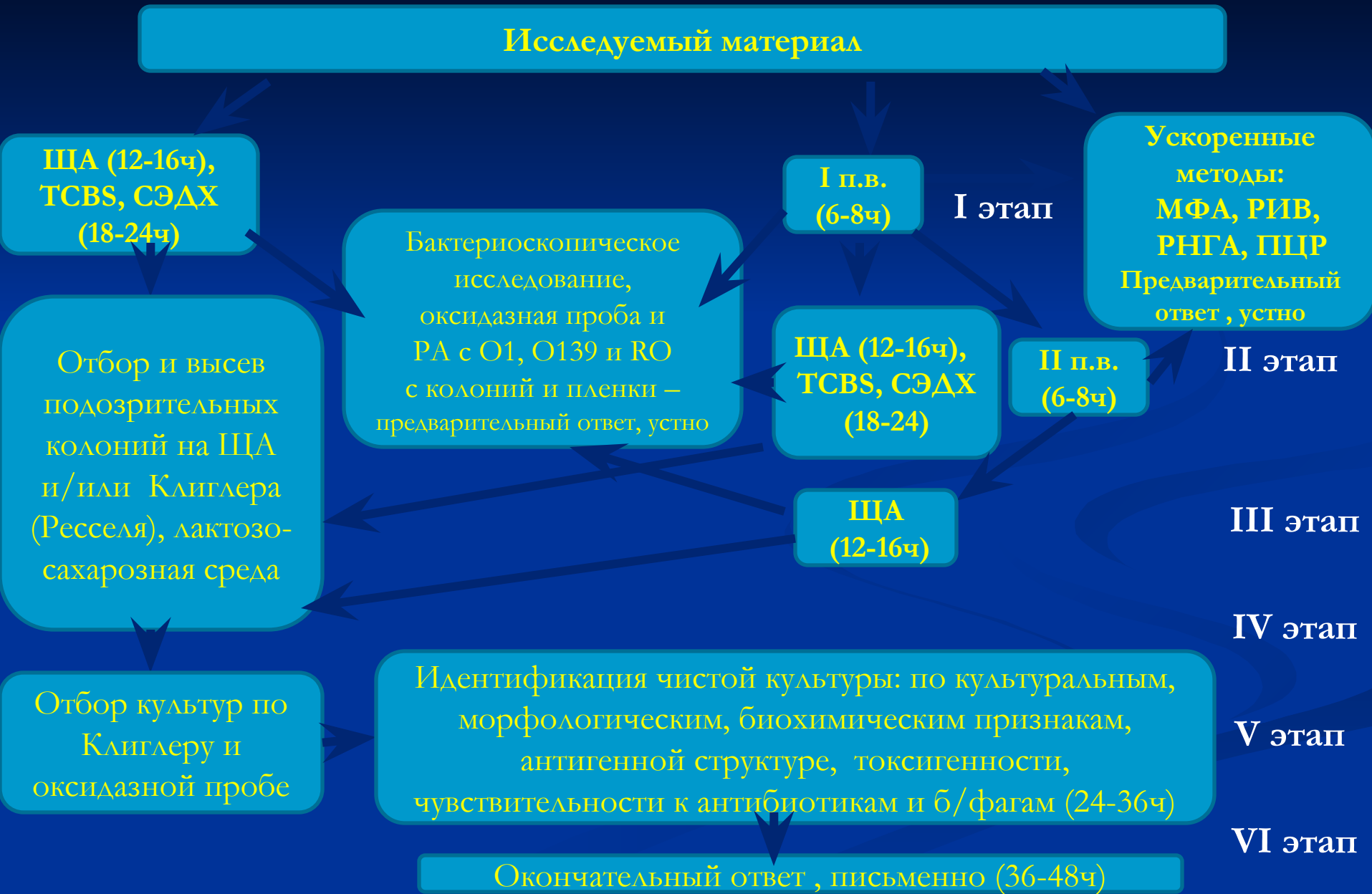
ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

ХОЛЕРЫ (МУК 4.2.2218-07)

МАТЕРИАЛ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ:

- Испражнения и рвотные массы (10-20 мл);
- Желчь – порции В и С (по 10-12 мл);
- Трупный материал (отрезки по 10 см верхней, средней и нижней частей тонкого кишечника и желчный пузырь целиком. Содержимое кишечника и желчь - по 10 мл);
- Предметы, загрязненные испражнениями (постельное и нательное белье и др.).

Этапы исследования:



I этап

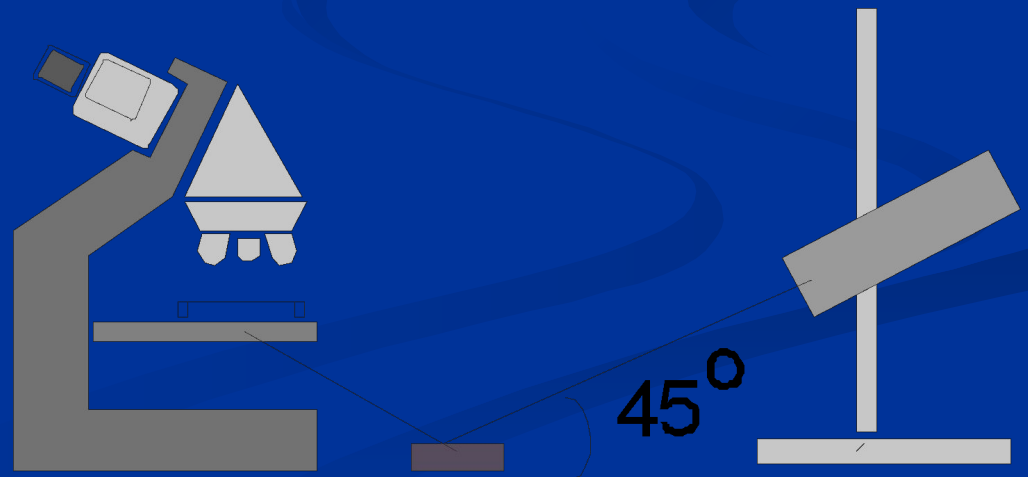
- Исследование нативного материала ускоренными методами: **МФА, РИВ, РНГА, ПЦР. Предварительный ответ, устно.**
-
- Исследуемый материал (фекалии) от больных в объёме 0,5-1,0 мл засевают в 50-100 мл накопительной среды – 1% пептонную воду. Если материал взят в колбу или во флакон с 50 мл 1% пептонной воды, то её используют как 1 среду накопления. Если материал взят в пробирку, то её содержимое выливают в колбу с 50 мл 1% пептонной воды (1 среда накопления).
- Одновременно петлей материал засевают на щелочной агар и одну из элективных сред ТСBS и др. Посевы помещают в термостат при температуре 37°C.

II этап

- Через **6-8 часов** с 1 среды накопления делают посев на 2 среду накопления (5-8 мл 1% пептонной воды) и одновременно большой бактериологической петлей с поверхностного слоя 1 среды накопления делают высев на щелочной агар и одну из элективных дифференциально-диагностических сред.
- Если в 1 среде накопления видна пленка и лёгкое помутнение среды, то делают мазок, смотрят подвижность, при возможности ставят с поверхностной пленки ориентировочную слайд-агглютинацию с холерной O1 сывороткой.

III этап

- Через **12-16 часов**, если есть рост на 2 среде накопления, делают высев на щелочной агар (3 чашка).
- Чашки просматривают в проходящем свете или с помощью лупы. Если на чашках есть подозрительные колонии, отбор колоний можно начинать уже на III этапе через 10-12 часов от начала исследования, в остальных случаях – через 18-24 часа.



IV этап

- Через **18-24 часа** - отбор подозрительных колоний в посевах на плотных средах нативного материала, а также в высевах из 1 и 2-ой накопительных сред. На щелочном агаре холерные вибрионы в S-форме вырастают в виде круглых, гладких, плоских, голубовато-прозрачных средней величины колоний с ровными краями. Через 10-12 ч их диаметр не превышает 1 мм, а к 18-24 ч достигает 2-3 мм. Темпы роста на элективных средах замедлены, поэтому просмотр следует проводить через 18-20 ч инкубации в термостате при температуре 37°C. Колонии на элективной среде TCBS имеют ярко-желтую окраску на зеленом фоне среды, полупрозрачные.

IV этап

- Из колоний, выросших на щелочном агаре, делают мазок, окрашивают по Граму, смотрят подвижность и ставят микроагглютинацию на стекле с холерной сывороткой O1 в разведении 1:50, 1:100. Если реакция положительная, то ставят реакцию агглютинации с варианто-специфическими сыворотками Инаба, Отава в том же разведении.
- При отборе колоний можно пользоваться тестом на оксидазу, применяя систему индикаторную бумажную (СИБ). Холерный вибрион дает положительную реакцию на оксидазу (фиолетовое или ярко красное окрашивание в зависимости от индикатора).
- Далее делают посеvy со щелочного агара на полиуглеводную среду Клиглера (Ресселя). При положительной реакции происходит изменение цвета столбика (сахароза) без изменения цвета скошенной части (лактоза) и без образования газа и сероводорода. Далее подозрительные колонии отсевают на косой или щелочной агар для выделения чистой культуры и проводят идентификацию на холеру.

Вэтап: Ідентіфікацыя культур холерных вібрыонаў

- Культуры, выдзеленыя на розных этапах, ідэнтыфіцыруюць з мэтай вызначэння іх прыналежнасці к віду *Vibrio cholerae* адпаведнай серогрупы (O1, O139 і др.).
- **Падварытэльную ідэнтыфікацыю** праводзяць па камплексу прызнакаў, уключаючы морфалогію колоній, падвільнасць, пробу на аксідазу і аглютынацыю на шкляне з сывороткамі O1 (1:100), RO (1:50) і O139. Для культур, станоўча рэагуючых з сывороткай O1, усталяваюць прыналежнасць к сералагічным варыянтам Інаба і Огава таксама ў слайд-аглютынацыі.
- **Аканчальную ідэнтыфікацыю** культур, выдзеленых на поліуглеводнай сродзе ці шчолачным агаре, аглютыніруючыхся на шкляне, праводзяць па **сокращенной** ці **полной** схеме.

Сокращённая схема идентификации:

- Морфология и подвижность микробных клеток
- Оксидазная проба
- Слайд-агглютинация с O1 или O139 сывороткой
- Развернутой РА с холерными сыворотками O1, Инаба, Отава, RO
- Чувствительность к холерным диагностическим фагам (классическому и эльтор)

- O/F тест и отношение к отдельным углеводам (манниту, маннозе, сахарозе и арабинозе в средах Гисса, а также лизину, орнитину и аргинину)

Оценка эпидемической значимости:

- Гемолитическая активность по Грейгу
- Чувствительность к фагам холерным эльтор stx⁺ и stx⁻

Ответ выдается письменно

БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ВИДОВ *V. CHOLERAЕ*

| Признаки | <i>V. cholerae cholera</i> | <i>V. cholerae eltor</i> | <i>V. cholerae bengalii</i> |
|--------------------------------------------------------------------------|----------------------------|--------------------------|-----------------------------|
| Реакция Фогеса-Проскауэра (образование ацетоина при ферментации глюкозы) | ± (чаще -) | ± (чаще +) | ± (чаще +) |
| Чувствительность к полимиксину В (50 ед/мл) | + | - | - |
| Чувствительность к классическому монофагу (С или 4 группа по Мукерджи) | + | - | - |
| Чувствительность к Фагу Эль-Тор V группы (по Мукерджи) | - | + | - |
| Гемолиз эритроцитов барана | - | ± | ± |
| Агглютинация куриных эритроцитов | - | + | + |
| Гексаминовый тест | - | + | - |
| Агглютинация с О-сывороткой: | + | + | + |
| O1 | + | + | - |
| O139 | - | - | + |

Идентификация атипичных культур холерных вибрионов.

- Антигенная изменчивость холерных вибрионов O1 может выражаться в ослаблении до 1/4 титра или утрате агглютинабельности холерными сыворотками O1, Инаба, Огава. Встречаются штаммы, агглютинирующиеся только холерной сывороткой O1 серогруппы и не реагирующие с варианто-специфическими сыворотками (Инаба и Огава), что делает невозможным установление их серовара.

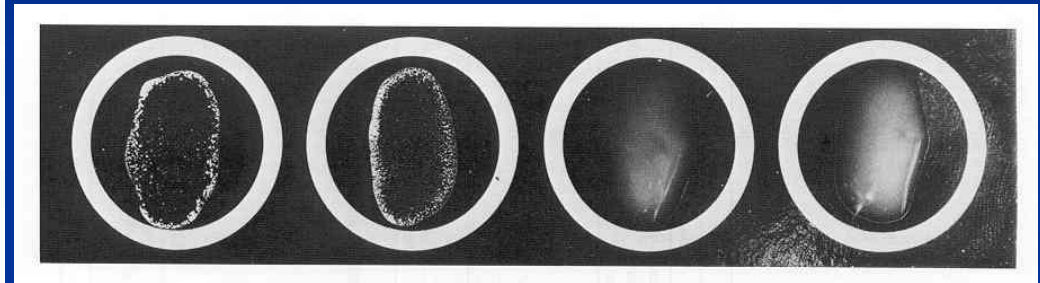
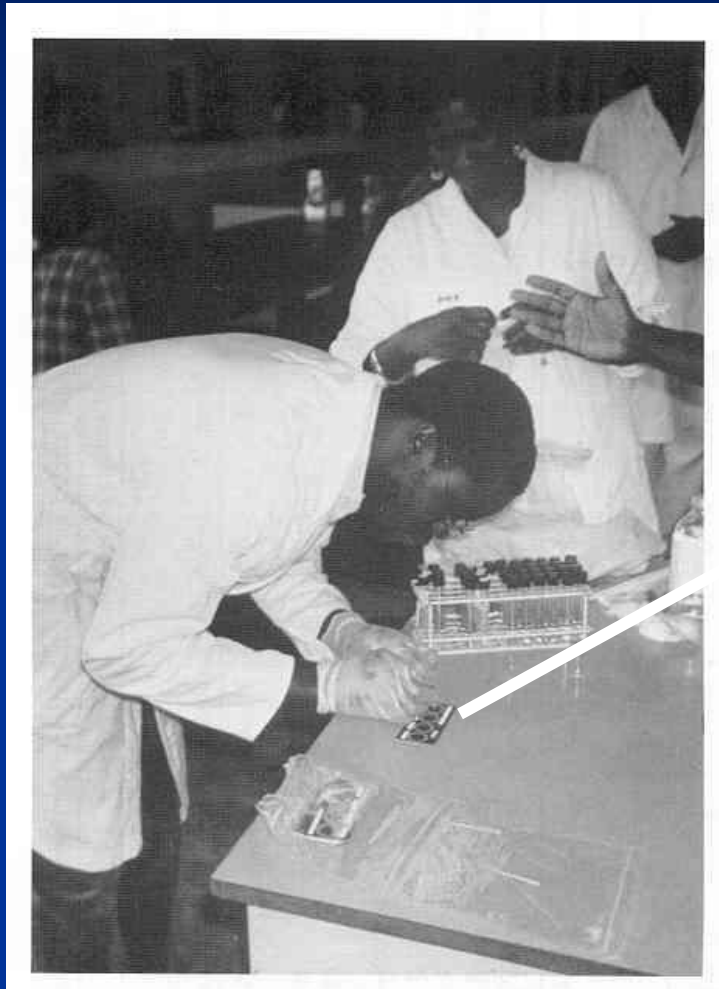
- В случае S-R диссоциации культуры холерных вибрионов агглютинируют RO-сывороткой. При этом в одних случаях штаммы агглютинируются всеми холерными сыворотками, в т.ч. и RO, их обозначают как SR-варианты, в других - измененные холерные вибрионы в диагностических титрах агглютинируются только с RO-сывороткой и не агглютинируются холерными сыворотками O1, Инаба и Огава, их относят к R-вариантам.

- В последние годы возросла частота встречаемости резистентных к диагностическим холерным фагам штаммов среди холерных вибрионов O1, выделяемых как от людей, так и из объектов окружающей среды.

Ускоренные методы диагностики

- Реакция иммобилизации вибрионов
- РИФ (МФА),
- ПЦР для обнаружения *ctx*- гена
- РНГА с применением эритроцитарных или полимерных иммуноглобулиновых O1, O139 диагностикумов
- РНаг

Латекс-агглютинация с образцами жидкого стула



+

+

-

-

J. J. FARMER III

F. W. HICKMAN-BRENNER *The Genera Vibrio and
Photobacterium// Procariotae*

Схема оценки эпидемической значимости *Vibrio cholerae* eltor
по чувствительности к бактериофагам ctx+ и ctx-
и гемолитической активности

| Группы | Варианты | Гемолиз по Грейгу | Чувствительность к фагам | | Оценка эпидемической значимости |
|--------|----------|-------------------|--------------------------|------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | | | ctx+ | ctx- | |
| I | 1 | - | + | - | Эпидемически опасны |
| II | 2 | - | - | - | Для оценки эпидемической значимости необходимы дополнительные исследования на наличие генов ctx АВ и tcp А или определение токсигенности на кроликах-сосунках |
| | 3 | - | + | + | |
| | 4 | + | + | + | |
| | 5 | + | + | - | |
| III | 6 | + | - | + | Эпидемически не опасны |
| | 7 | + | - | - | |
| | 8 | - | - | + | |

- Окончательный положительный ответ должен быть выдан устно и письменно через 36-48 часов по результатам полной, сокращенной или ускоренной идентификации выделенной культуры с определением вида, серогруппы (и сероварианта для O1), биовара, эпидемической значимости и антибиотикограммы.
- На культуры, которые агглютинируются холерной сывороткой O1 до 1/4 титра, но не чувствительны к фагам в рабочем разведении, также выдают положительный ответ о принадлежности культуры к *Vibrio cholerae* O1.

- **Окончательную оценку вирулентности холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп дают в специализированных лабораториях по данным молекулярного зондирования на ген холерного токсина в реакции ПЦР.**
- **Отрицательный ответ** выдают через 36-48 часов - только после окончания исследования по полной схеме.

Серологический метод:

- Определение агглютининов в сыворотке крови (развернутой РА – серовары Огава, Инаба и О139 (ДТ – 1:40 и ↑); РНГА (ДТ – 1:40 и ↑); РНАг (ДТ – 1:50 (1:80) и ↑)
- Определение вибриоцидных антител (РВА) в сыворотке крови (вибриоцидным титром – гибель не менее 50% клеток холерного вибриона)
- Определение токсиннейтролизующих антител в сыворотке крови (РНГА с эритроцитарным холерным энтеротоксическим диагностикумом (ЭХЭД) - ДТ – 1:160 и ↑)

■ Критерии ЧП:

- в неэндемических районах – *единичный подтвержденный местный случай;*
- в эндемических районах – *резкое повышение заболеваемости по сравнению с обычным уровнем, особенно при появлении множественных очагов и летальных исходов*

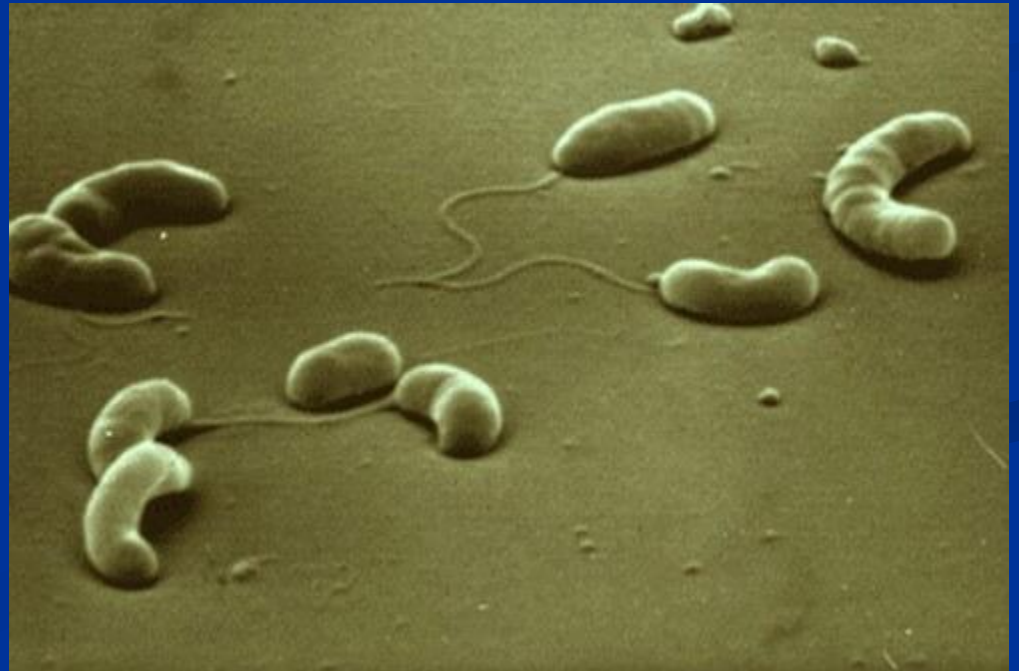


Примерный штат лаборатории на 1000 анализов в сутки
(700 от людей и 300 – воды) при 36-часовой рабочей
неделе по МУ 3.4.1030-01

| № | Функциональная группа | Врачи | Лабо- ранты | Сани- тарки |
|---|---------------------------------------|-----------|----------------|----------------|
| 1 | Группа приема материала | - | 7 | - |
| 2 | Группа пересевов | - | 6 | - |
| 3 | Группа просмотра п-в и отбора колоний | 7 | 3 | - |
| 4 | Группа идентификации и уск. д-ки | 7 | 9 | - |
| 5 | Группа обеззараживания материала | - | 5 | - |
| 6 | Группа мойки посуды и стерилизации | - | 3 | 22 |
| 7 | Группа розлива и подготовки сред | - | 8 | - |
| 8 | Группа регистрации и выдачи ответа | 1 | 3 | - |
| 9 | Группа мат.-тех. обеспечения | - | 1 | 8 |
| | Итого: | 15 | 45 | 30 |

Этиотропная терапия

- Антибиотики (тетрациклин, доксициклин),
Антибиотик резерва- ципрофлоксацин
- Симптоматическая терапия



Специфическая профилактика

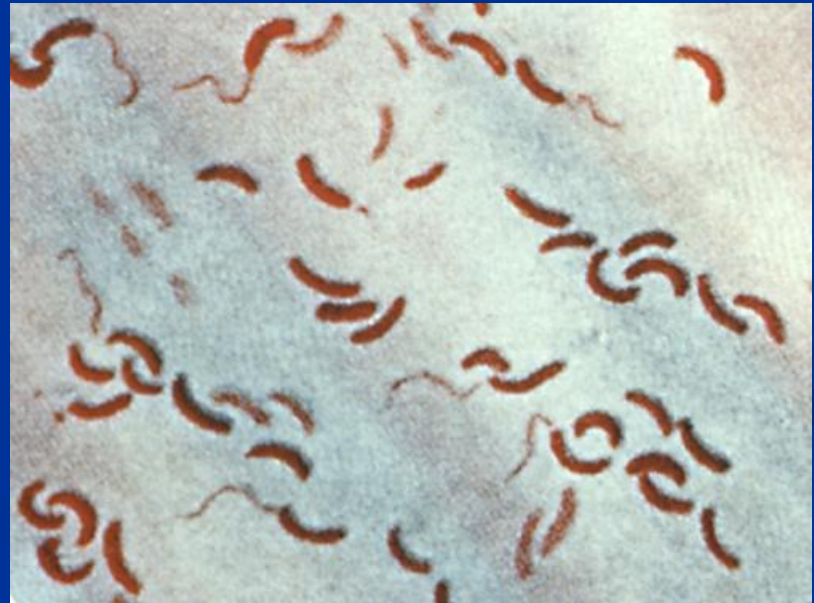
Вакцинация по эпидемическим показаниям.

- Холероген-анатоксин
- Химическая холерная вакцина
- Корпускулярная убитая вакцина



Галофильные вибрионы

Большой вклад в изоляцию и исследование галофильных вибрионов был внесен японскими исследователями Т. Фуджино и Р. Саказаки.



Галофильные вибрионы широко распространены в воде морей и океанов. Они обнаружены в морских гидробионтах (рыба, моллюски), водорослях, иле и соленой воде.

Известно более 30 видов галофильных вибрионов, причем 17 из них способны вызывать заболевания у человека



| Название вибриона | Вызываемые заболевания |
|---------------------------|---------------------------------------------------------|
| <i>V.parahaemolyticus</i> | Гастроэнтериты, раневые инфекции и инфекции глаз |
| <i>V.alginolyticus</i> | Раневые инфекции, наружные отиты |
| <i>V.furnissii</i> | Гастроэнтериты |
| <i>V.hollisae</i> | Гастроэнтериты |
| <i>V.damsela</i> | Раневые инфекции |
| <i>V.vulnificus</i> | Септицемии или раневые инфекции, пневмонии, эндометриты |
| <i>V.fluvialis</i> | Гастроэнтериты, раневые инфекции |

Морфология

- В мазках галофильные вибрионы имеют вид прямых или слегка изогнутых палочек с закругленными концами длиной до 1-3 мкм, шириной 0,2-0,4 мкм, лежащих хаотично отдельно друг от друга.
- характерен полиморфизм. Могут встречаться шаровидные формы, в некоторых случаях образуются нити.
- Спор и капсул галофильные вибрионы не образуют. Хорошо красятся анилиновыми красителями, грамотрицательны.
- подвижны благодаря наличию полярно расположенного жгутика или пучка жгутиков.

АГ- свойства

О-АГ соматический - термостабилен, выдерживает нагревание до $+100^{\circ}\text{C}$, не разрушается под действием спирта и соляной кислотой

К-АГ поверхностно-капсульный - термолабилен, причем их сочетание стабильно.

Наборы агглютинирующих О- и К-сывороток для серологического типирования выпускаются пока только в Японии.

- Н-АГ жгутиковый - термолабилен, неспецифичен, встречается у всех вибрионов в жгутиках.

Культуральные свойства

Мезофилы, размножаются при t° от $+12,8^{\circ}\text{C}$ до $+43^{\circ}\text{C}$
(оптимальная температура $+35^{\circ}\text{C}$, $+37^{\circ}\text{C}$).

Факультативные анаэробы,

хорошо растут на питательных средах с
обязательным содержанием NaCl от $0,5\%$ до 10% .
(в жидких средах галофильные вибрионы растут
при более высоких концентрациях NaCl).

- концентрация водородных ионов (pH) - от $6,0$ до $10,0$ (оптимальная $7,5-8,5$).

- На плотных средах образуют разнообразные по морфологии формы колоний и менее прозрачные. Характерен феномен роения.
- Для культивирования галофильных вибрионов используют питательные среды: Касаткиной, ТСBS-агар, среды Эндо, Плоскирева, щелочной агар и пептонную воду с 3% NaCl.



Характер роста вибрионов на среде TCBS

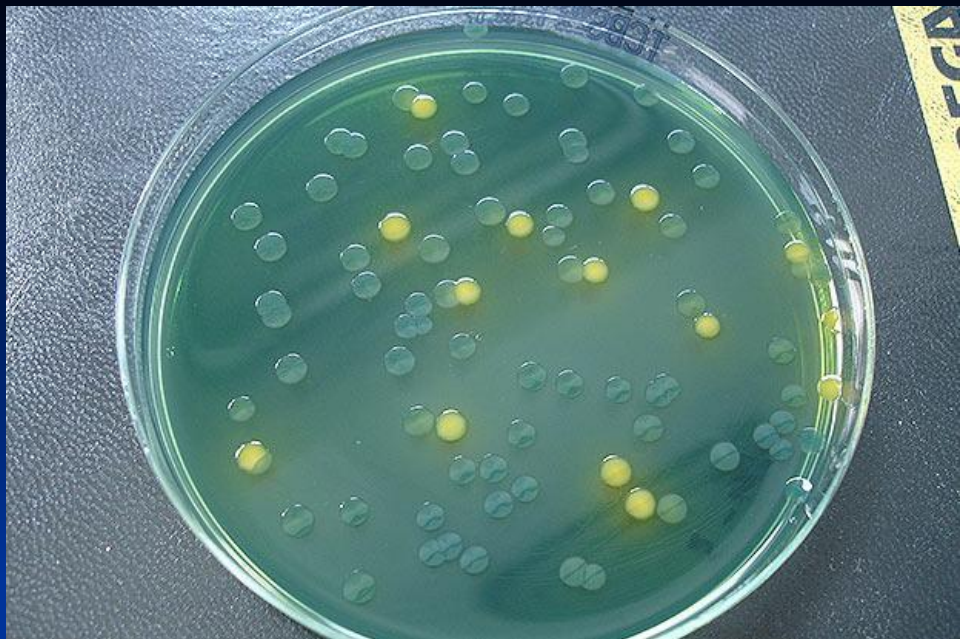
| Организм | Цвет колоний % | | Интенсивность роста | Клиническая значимость |
|----------------------------|----------------|--------|---------------------|------------------------|
| | Зеленый | Желтый | | |
| <i>V. cholerae</i> | 0 | 100 | ++++ | ++++ |
| <i>V. mimicus</i> | 100 | 0 | ++++ | ++ |
| <i>V. metschnikovii</i> | 0 | 100 | ++ | +/- |
| <i>V. hollisae</i> | 100 | 0 | + | ++ |
| <i>V. damsela</i> | 95 | 5 | ++ при 36 °C | ++ |
| <i>V. fluvialis</i> | 0 | 100 | ++++ | ++ |
| <i>V. furnissii</i> | 0 | 100 | ++++ | ++ |
| <i>V. alginolyticus</i> | 0 | 100 | ++++ | ++ |
| <i>V. parahaemolyticus</i> | 99 | 1 | ++++ | ++++ |
| <i>V. vulnificus</i> | 90 | 10 | ++++ | +++ |
| <i>V. carchariae</i> | 0 | 100 | ++++ | +/- |
| <i>V. cincinnatiensis</i> | 0 | 100 | + | +/- |

CHROMagar™ Vibrio



Патоген Хромогенный Соки

CHROMagar



- При росте в жидких средах галофильные вибрионы образуют плотную, грубую пленку, или она вообще может отсутствовать.

Резистентность

- Сохраняют жизнеспособность при температуре $+4^{\circ}\text{C}$ в течение 2-3 суток. При этой температуре происходит постепенное отмирание клеток, но единичные особи выживают до 8 суток.
- При комнатной температуре ($+18^{\circ}\text{C}$, $+20^{\circ}\text{C}$) галофилы способны выживать длительное время. При нагревании до $+60^{\circ}\text{C}$, $+80^{\circ}\text{C}$ отдельные клетки выживают в течение 15 минут. При низких температурах – они могут выживать до 1-2 месяцев.
- Вибрионы чувствительны к левомецетину, тетрациклину, фуразолидону, стрептомицину, полимиксину В, рифампицину, гентамицину.

Распределение галофильных вибрионов, патогенных для человека по группам Хейберга

| Виды вибрионов | Ферментация | | | Группа Хейберга |
|---------------------------|---------------|---------|--------------|--------------------|
| | Арабино за | Манноза | Сахароз а | |
| <i>V.fluvialis</i> | + | + | + | III |
| <i>V.vulnificus</i> | - | + | - | V |
| <i>V.alginolyticus</i> | -(+) | + | + | I,III |
| <i>V.parahaemolyticus</i> | +(-) | + | - | VII,V |
| <i>V.hollisae</i> | + | -(+) | + | VIII,VII |
| <i>V.furnissii</i> | + | +(-) | + | III,IV |
| С образованием газа | | | | |
| <i>V.damsela</i> | - | + | - | V |

Основные свойства галофильных вибрионов

| ПРИЗНАКИ | Виды галофильных вибрионов | | | | | | |
|----------------------------------|----------------------------|--------------|-----------------|--------------------|------------|-------------|-----------|
| | V.fluvialis | V.vulnificus | V.alginolyticus | v.parahaemolyticus | V.hollisae | V.furnissii | V.damsela |
| Подвижность | + | + | + | + | + | + | + |
| Тест Хью-Лейфсона | +/+ | +/+ | +/+ | +/+ | +/+ | +/+ | +/+ |
| Чувствительность к O/129 | + | + | + | + | + | + | + |
| Образование газа из глюкозы | - | - | - | - | - | + | + |
| Образование газа из арабинозы | + | - | - | +(-) | -(+) | + | +(-) |
| Образование газа из маннозы | + | + | + | + | -(+) | +(-) | |
| Образование газа из сахарозы | + | - | + | - | - | + | - |
| Ферментация лактозы | - | + | - | - | - | - | - |
| Ферментация целлобиозы | -(+) | + | - | - | - | -(+) | - |
| Ферментация маннита | + | +(-) | + | + | - | + | - |
| Ферментация салицина | - | + | - | - | - | - | - |
| Образование ацетилметилкарбинола | - | - | + | - | - | - | + |
| Рост с 6%NaCl | +(-) | + | + | + | + | + | + |
| Рост с 10%NaCl | -(+) | - | + | - | - | - | - |
| Восприимчивость к | + | + | | | | + | |

БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

ОТНОШЕНИЕ ПАТОГЕННЫХ ВИБРИОНОВ К ДИФФЕРЕНЦИРУЮЩИМ УГЛЕВОДАМ

| Виды вибрионов | Ферментация | | |
|----------------------------|-----------------------------------------|---------|----------|
| | арабинозы | маннозы | сахарозы |
| <i>V. cholerae</i> | - | + | + |
| <i>V. mimicus</i> | - | + | - |
| <i>V. metschnikovii</i> | - | +/- | + |
| <i>V. fluvialis</i> | + | + | + |
| <i>V. vulnificus</i> | - | +(-) | -(+) |
| <i>V. alginolyticus</i> | - | + | + |
| <i>V. parahaemolyticus</i> | +(-) | + | -(+) |
| <i>V. hollisae</i> | + | -(+) | - |
| <i>V. furnissii</i> | + | +(-) | + |
| | с образованием газа | | |
| | - | + | - |
| <i>V. damsela</i> | с образованием газа у некоторых штаммов | | |
| <i>V. cincinnatiensis</i> | + | x | + |
| <i>V. harveyi</i> | - | x | +(-) |

Условные обозначения: () - в скобках указан редко встречающийся вариант; +/- - приблизительно 50% штаммов не обладают этими признаками; X - нет данных.

Вирулентность

- адгезины, обуславливающие их выраженные адгезивные свойства,
- фермент лецитиназа,
- основной фактор патогенности термостабильный гемотоксин, определяет прямой гемолиз и термолабильный гемолизин
- энтеротоксины и цитолизины



- характерный признак патогенных штаммов *V.parahaemolyticus* - способность к гемолизу эритроцитов кролика или человека на агаре, содержащем 7%NaCl.

Этот тест получил название «феномена Канагава».

Штаммы, обладающие этим свойством, относятся к канагава-положительным, не обладающие – к канагава-отрицательным.

Этиопатогенез

Источником инфекции являются морепродукты не прошедшие надлежащей кулинарной обработки или инфицированные вибрионами после приготовления, в результате нарушения правил хранения и транспортировки готовой продукции, а также морская вода.

Кишечные заболевания

в виде трех клинических форм:

- гастроэнтеритической (наиболее часто встречающейся),
- дизентерие- и
- холероподобной, при разной тяжести состояния.

Внекишечные заболевания

- После ранений у иммунодефицитных людей и у наркоманов после инъекций могут развиваться абсцессы на руках и ногах, причиной которых является заражение инъекционных ран и раневых участков морскими галофильными вибрионами. В этом участвуют *V.alginolyticus*, *V.vulnificus*, *V.parahaemolyticus* и др.



Лабораторная диагностика

галофильных инфекционных заболеваний вне зависимости от клинической формы сводится:

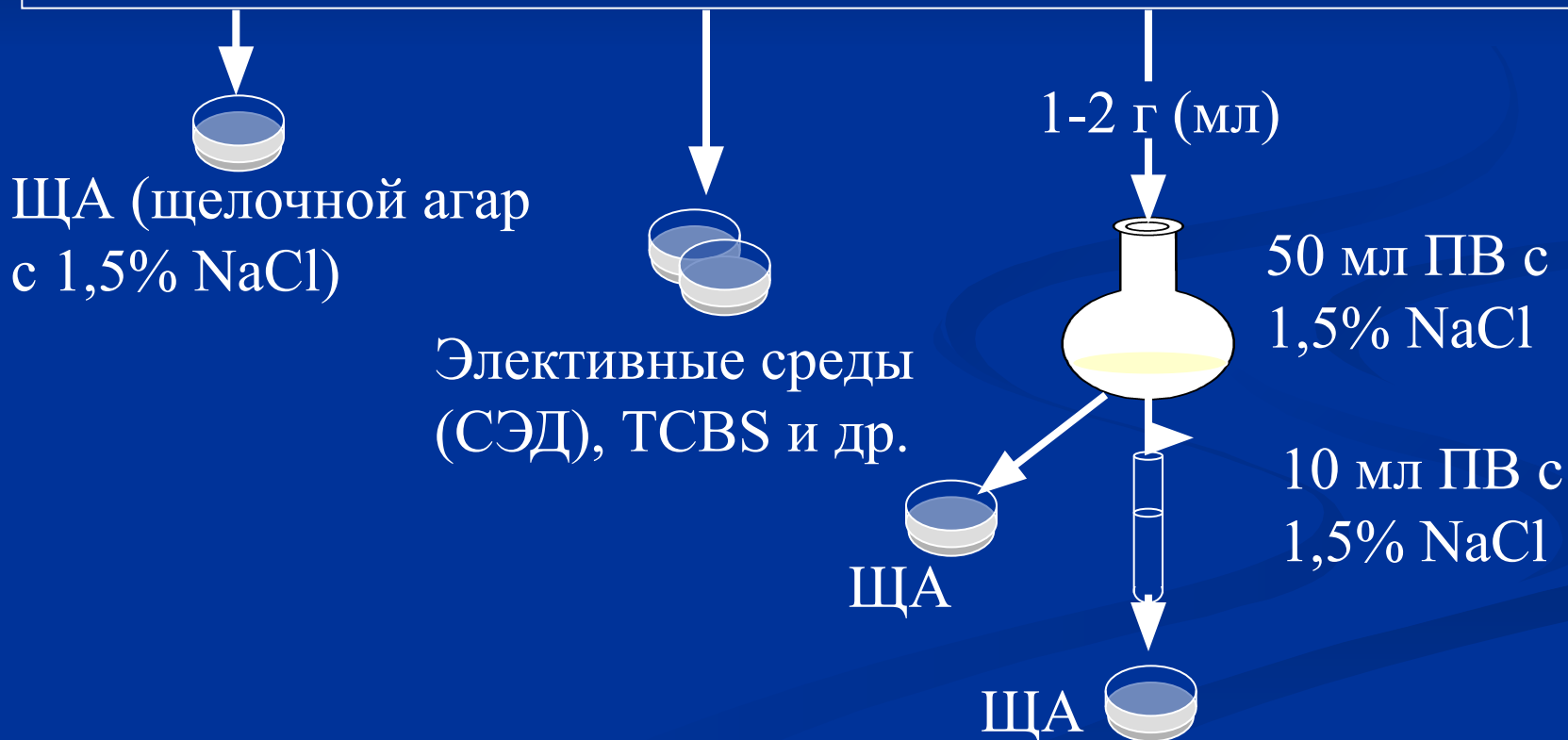
- микроскопическому
- бактериологическому методу с выделением чистой культуры возбудителя и его идентификацией.

Критерии диагностики пищевых отравлений вызываемых *V.parahaemolyticus*

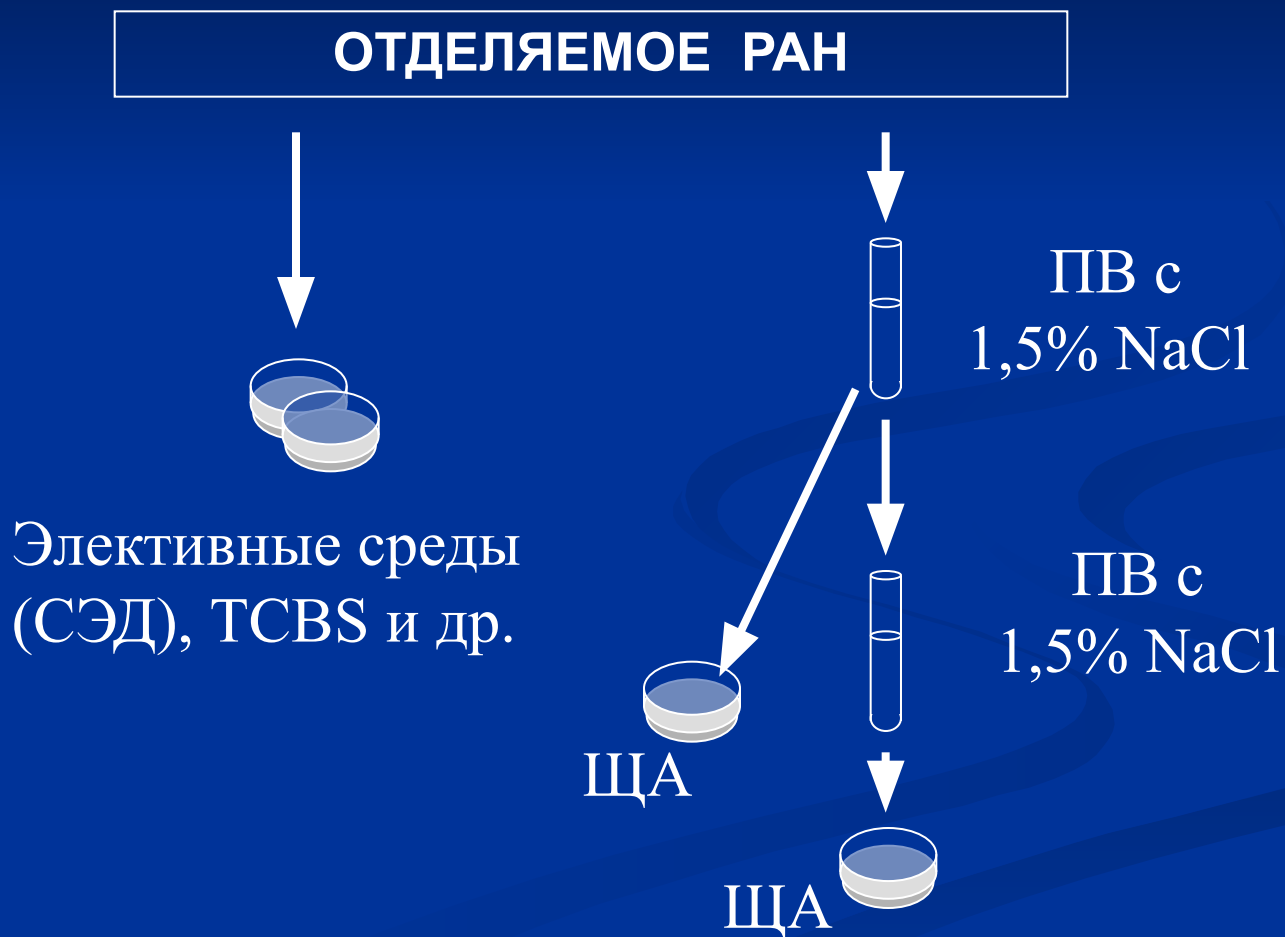
«Критериями диагностики заболеваний вызванных *V.parahaemolyticus* является обнаружение их в подозреваемом продукте в количестве 10^6 и более живых клеток в 1 г/мл, с одновременным обнаружением того же типа возбудителя в кале пострадавших»

Посев материала (1-2 дни исследования) согласно МУК 4.2.1793-03

**РВОТНЫЕ МАССЫ, ПРОМЫВНЫЕ ВОДЫ ЖЕЛУДКА,
ИСПРАЖНЕНИЯ**



Посев материала (1-2 дни исследования) согласно МУК 4.2.1793-03



Кровяно - солевой агар (среда Wagatsuma)

- Дрожжевой экстракт - 5 г
- Пептон - 10 г
- Натрий хлористый - 70 г
- Маннит - 5 г
- Агар - 15 г
- 0,1% кристалл-виолет – 0,01 мл
- Дистиллированная вода - 1 л

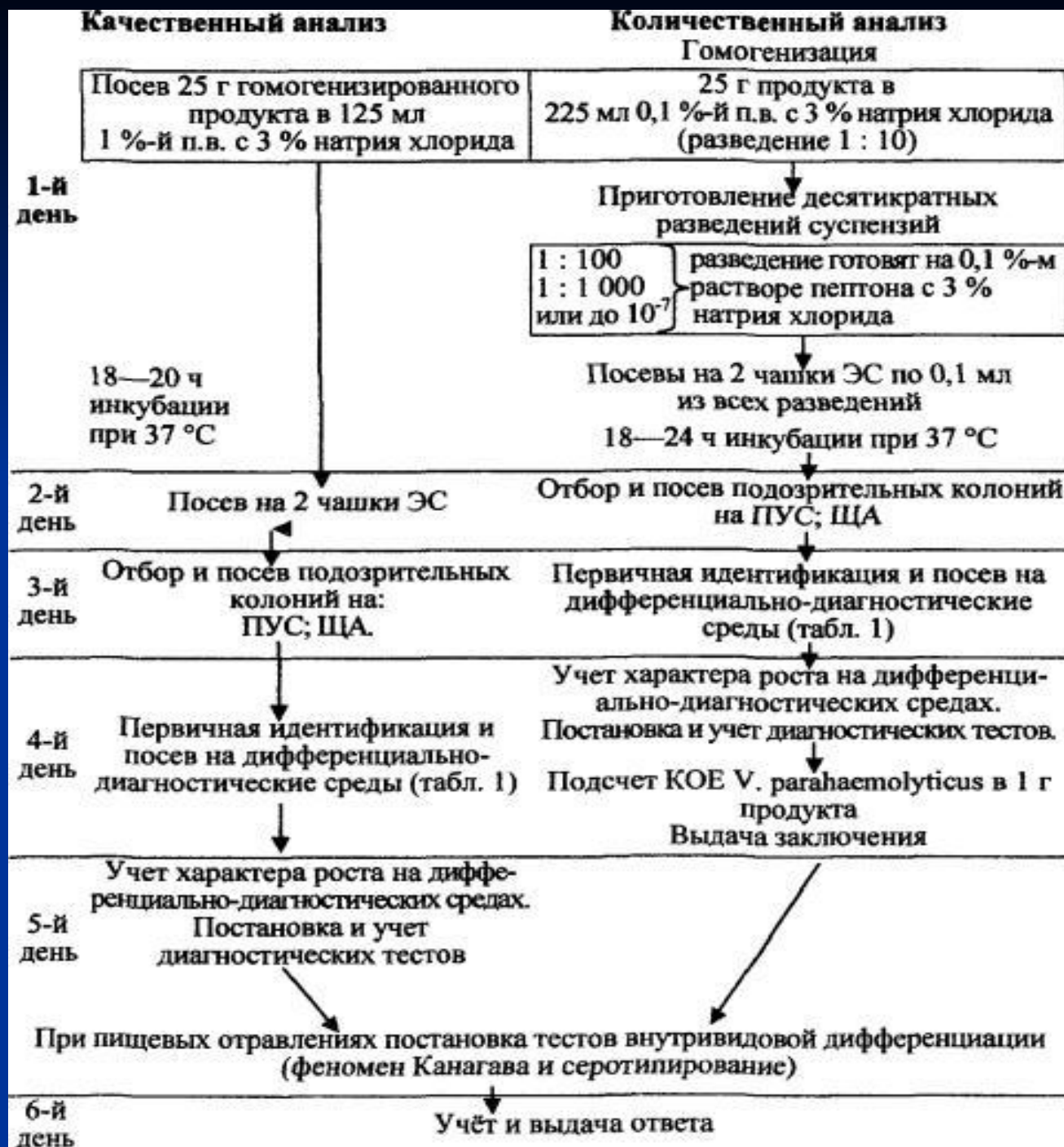
Растворяют все ингредиенты в воде, кипятят, устанавливают рН 7,5.
НЕ СТЕРИЛИЗУЮТ. Охлаждают до 50 °С и добавляют 10% отмытых человеческих эритроцитов и разливают в чашки

Среду инкубируют при 35 °С 18-20 часов.

Энтеропатогенные *V.parahaemolyticus* вызывают гемолиз эритроцитов

Инструкция ... №1135-73

Штаммы дифференцируются по чувствительности к бактериофагам. Различают А, В, С и D монофаги, способные лизировать до 60% штаммов галофильных вибрионов, выделенных из разных экосистем.



Лечение

- восстановление нормального водно-солевого обмена или регидратация
- Этиотропная терапия показана при тяжелом и длительном течении заболевания- тетрациклин, препараты нитрофуранового ряда.
- При септических процессах и раневых инфекциях- карбенициллин, цефалотин, хлорамфеникол, гентамицин или тетрациклин

- Благодарим за внимание!