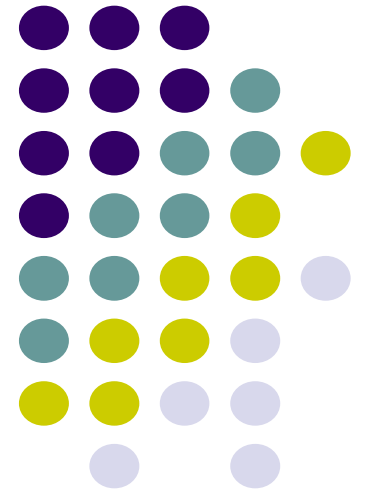
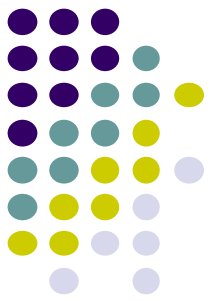




**FAMILIA ENTEROBACTERIACEAE.  
MICROBIOLOGIA SI DIAGNOSTICUL  
DE LABORATOR AL DIZENTERIEI  
BACTERIENE**



# FAMILIA ENTEROBACTERIACEAE



- Peste 50 de genuri cu peste 250 specii
- Habitat: intestinul omului, animalelor.  
Pot fi intalnite pe sol, plante, in apa, etc
- Majoritatea fac parte din microflora normală (comensală) intestinală
- Martori de contaminare fecală a mediului

# CLASIFICAREA



- ÎN FUNCȚIE DE PATOGENITATE:



**Enterobacteriaceae patogene:** genurile *Shigella*, *Salmonella*, unele specii ale genurilor *Yersinia* și *Klebsiella* (*Yersinia pestis*, *Klebsiella pneumoniae*), unele variante ale speciei *Escherichia coli*;



**Enterobacteriaceae condiționat patogene:** genurile *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Proteus*, *Providencia*, *Serratia*, *Edwardsiella*, etc

# Family Enterobacteriaceae

## Primary Pathogens

Organisms capable of causing disease in anyone

*Shigella*

*Salmonella*

*Yersinia*

*Escherichia coli*

*Klebsiella pneumoniae*

*Proteus*

*Serratia*

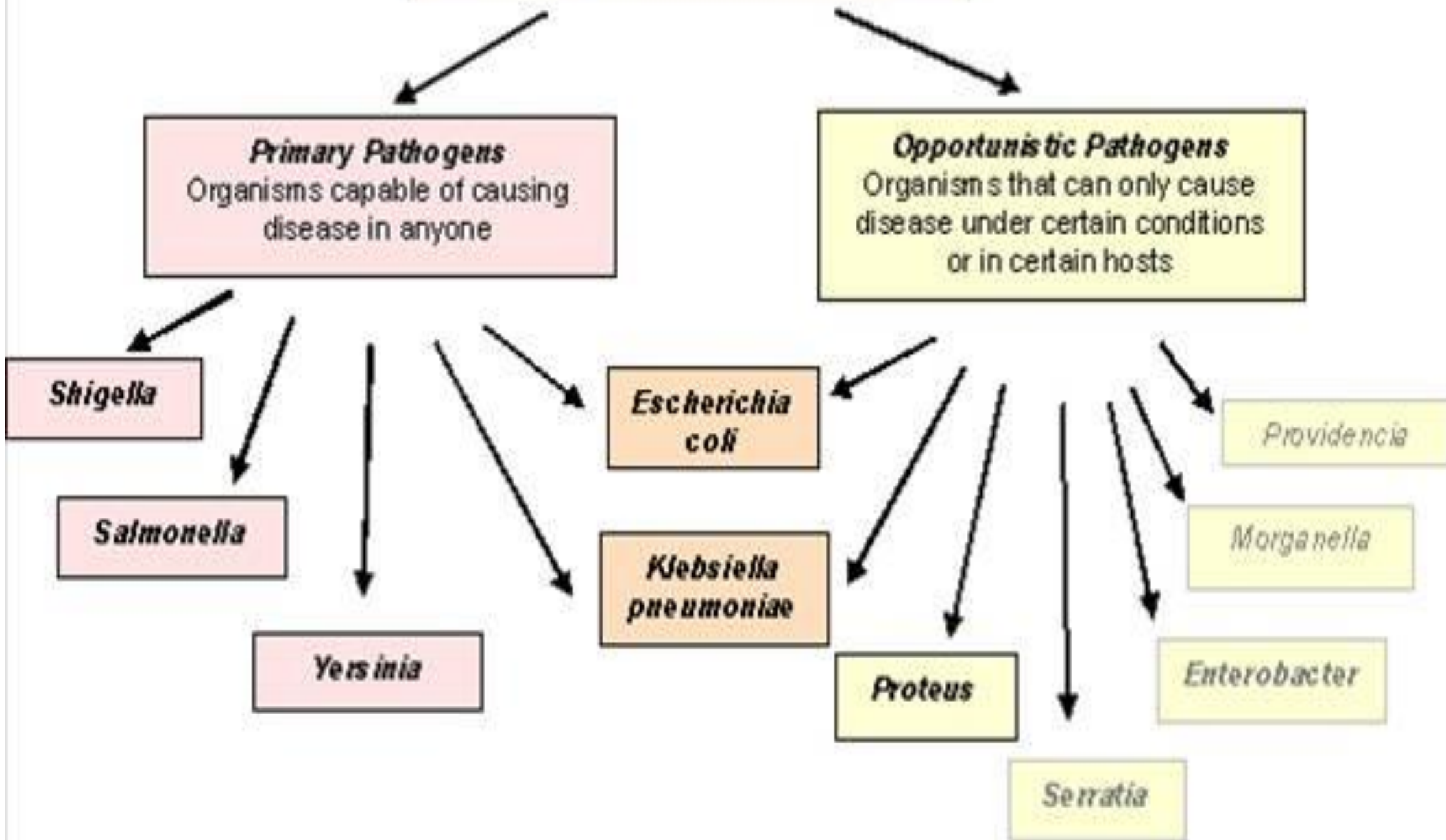
*Providencia*

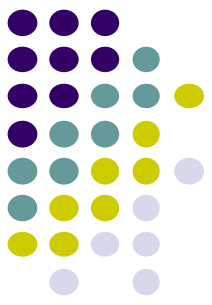
*Morganella*

*Enterobacter*

## Opportunistic Pathogens

Organisms that can only cause disease under certain conditions or in certain hosts













Prezintă interes diagnostic diferențierea enterobacteriaceelor în 2 grupe:

- Enterobacteriaceae **lactozo-pozitive** – *Escherichia* și alte genuri condiționat-patogene
- Enterobacteriaceae **lactozo-negative** – *Salmonella, Shigella, Yersinia* (patogene)

# TESTE-CHEIE ALE FAMILIEI ENTEROBACTERIACEAE

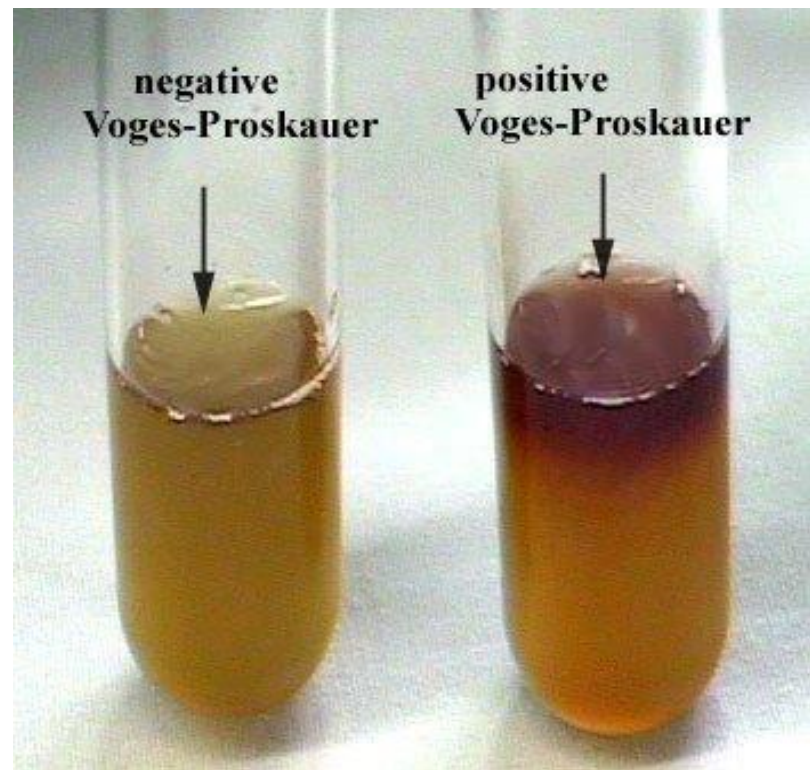
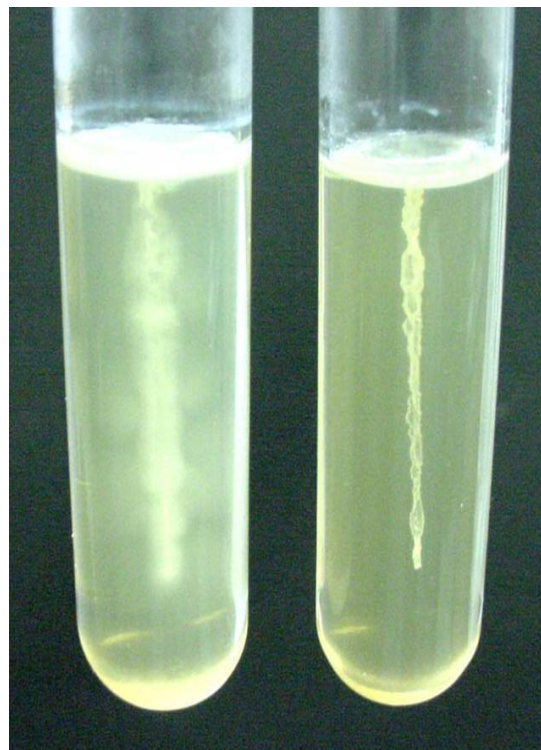
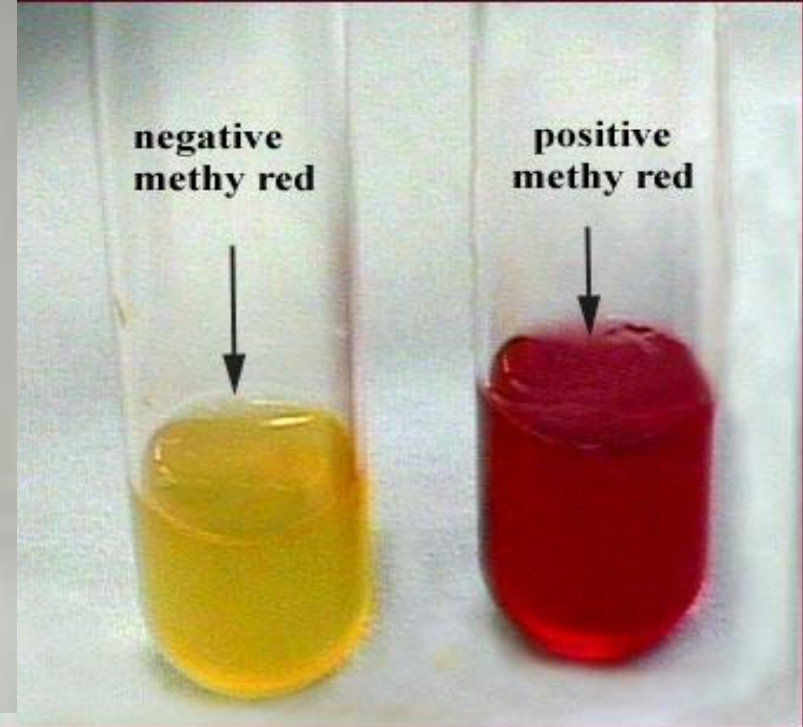
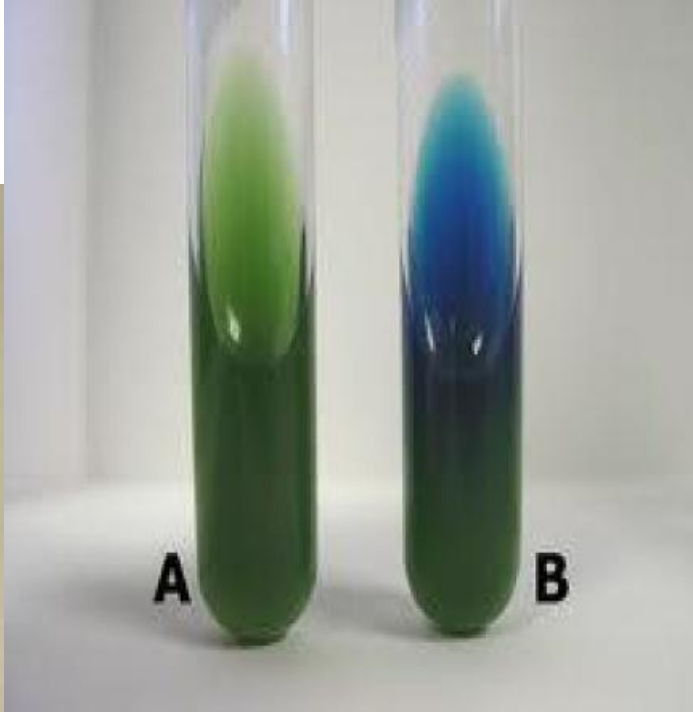
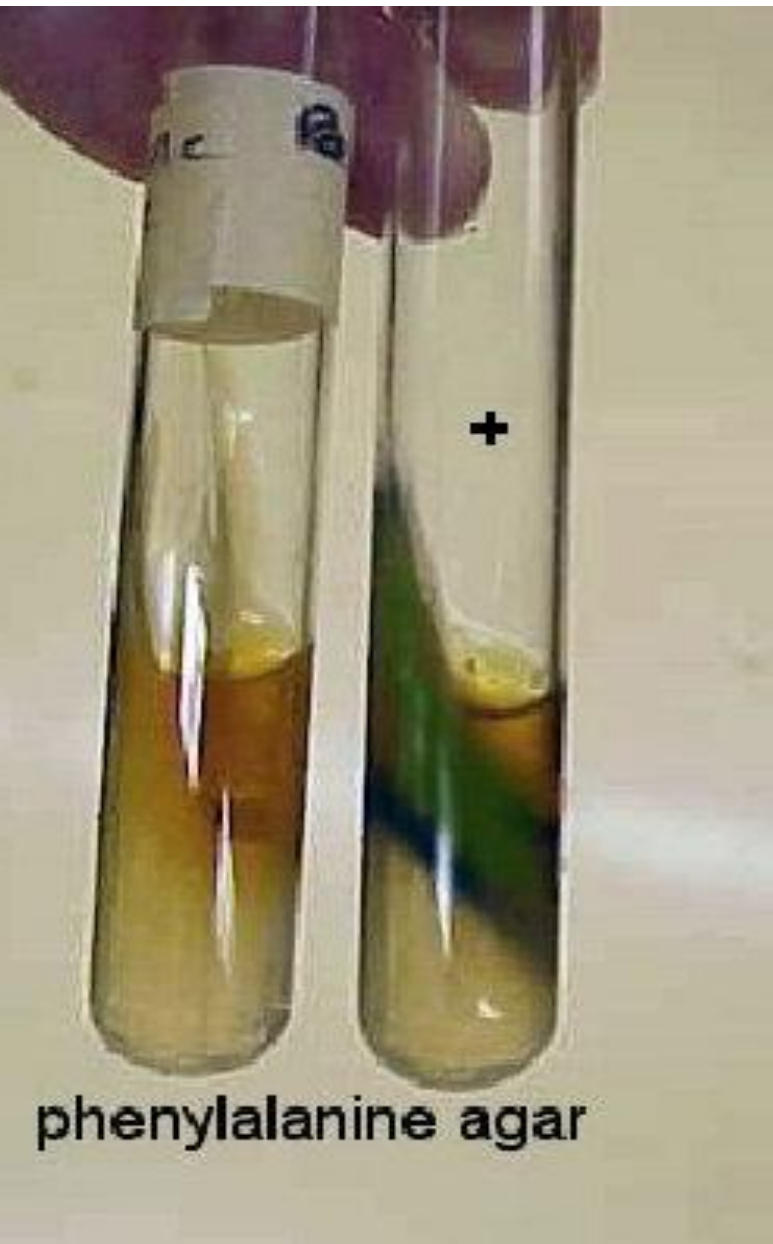


-  Bacterii (bastonașe) gramnegative
-  Nesporogene
-  Mobile-peritriche sau imobile
-  Facultativ-anaerobe
-  Fermentează glucoza până la acid (A) sau acid și gaz (AG)
-  Catalazo-pozitive
-  Oxidazo-negative
-  Reduc nitrații în nitriți

# TESTE PRIMARE (identificarea genurilor)



- Utilizarea citratului de Na (mediul Simmons)
- Utilizarea malonatului de Na
- Hidroliza ureei (testul Preus)
- Decarboxilarea lizinei (LDC)
- Dezaminarea fenilalaninei (FAD) cu formare de acid fenilpiruvic
- Producere de H<sub>2</sub>S în mediul multitest (ex.: Kligler)
- Fermentarea glucozei până la acizi (testul MR - metil rosu)
- Fermentarea glucozei până la acetoină / acetilmetincarbinol (testul VP – Voges Proskauer)
- Mobilitatea (în geloză semilichidă)



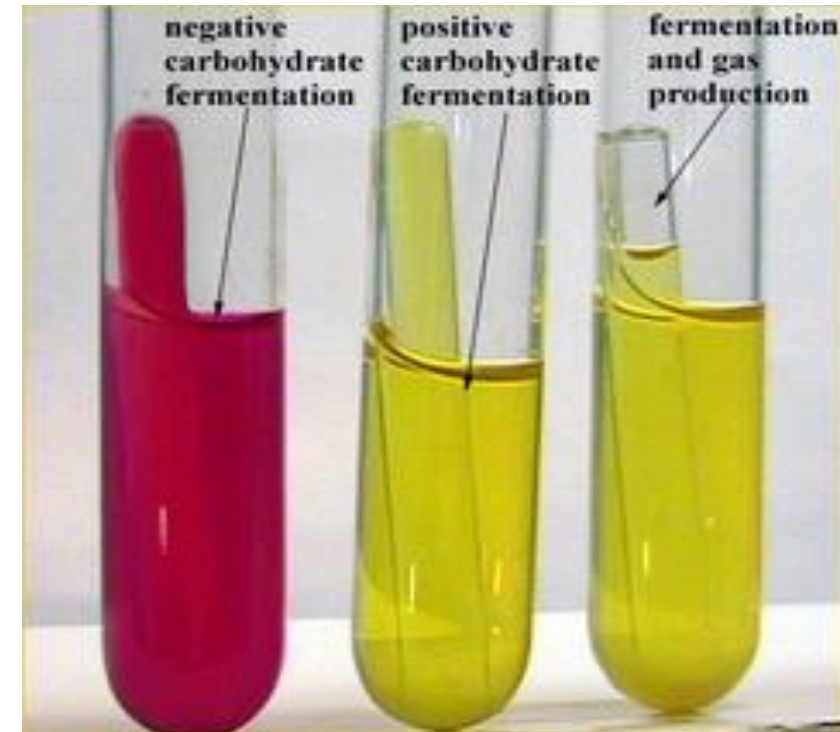


# TESTE SECUNDARE

(**identificarea speciilor/variantelor**)



- Teste biochimice (fermentarea glucidelor, decarboxilarea aminoacizilor (arginină, ornitină), producerea indolului, etc)
- Fagoidentificarea și lizotipia
- Seroidentificarea
- Antibiograma
- Colicinogenotipia



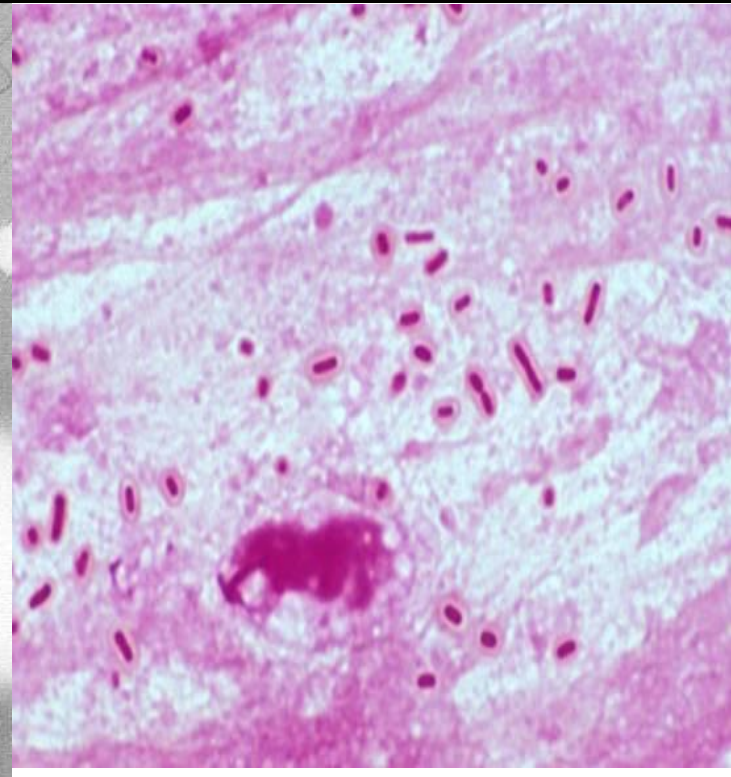
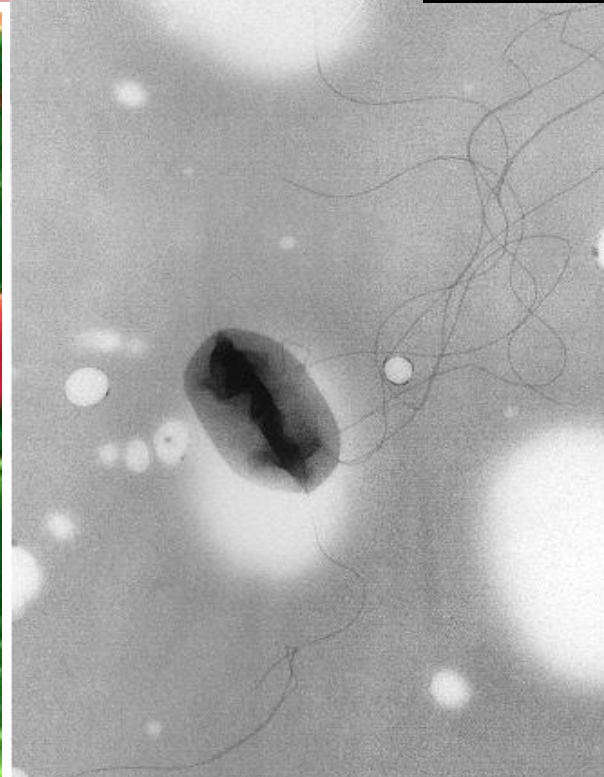
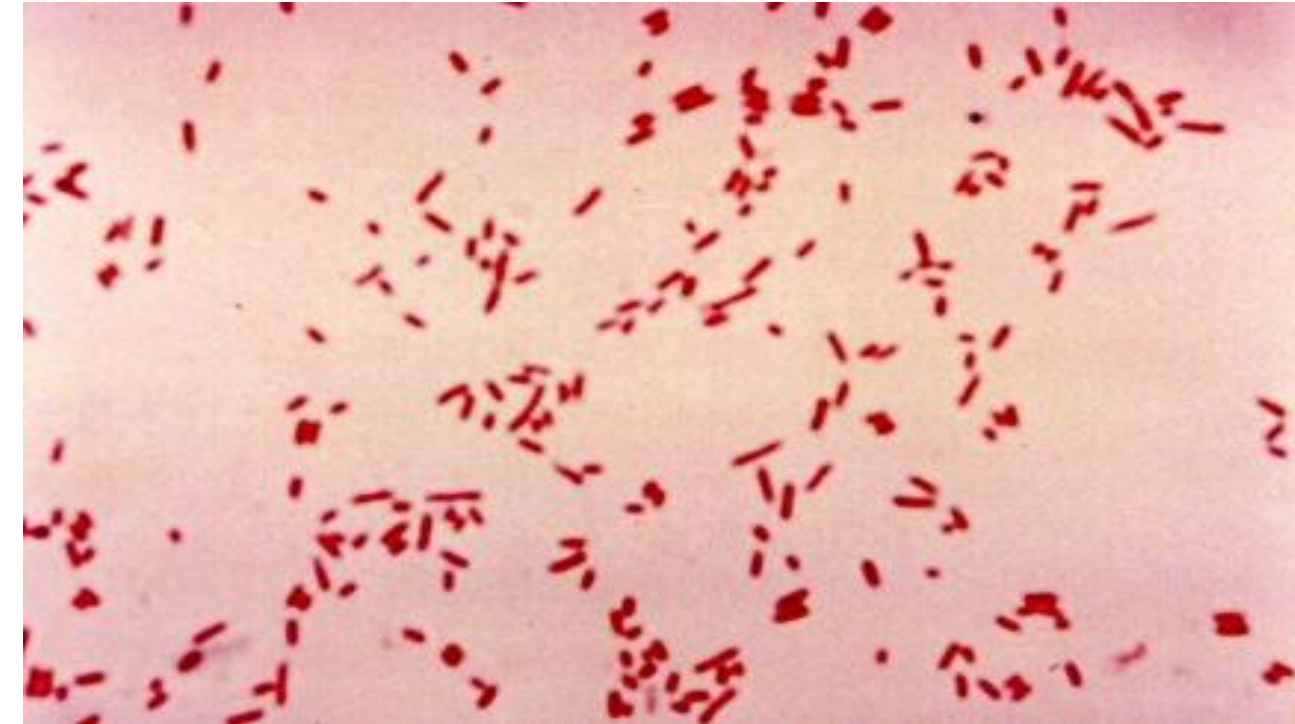
# CARACTERE MORFOBIOLOGICE

## ale bacteriilor din familia

### Enterobacteriaceae



- **Caractere morfologice:** bastonașe  
G-,  
1 - 6  $\mu\text{m}$  x 0,3 - 1  $\mu\text{m}$ , mobile  
peritriche (*Shigella*, *Klebsiella*,  
*Yersinia pestis* – imobile),  
nesporogene, formează  
microcapsule (*Klebsiella* –



Copyright © 2004 Dennis Kunkel Microscopy, Inc.



- **Caractere de cultură:**



Facultativ anaerobe



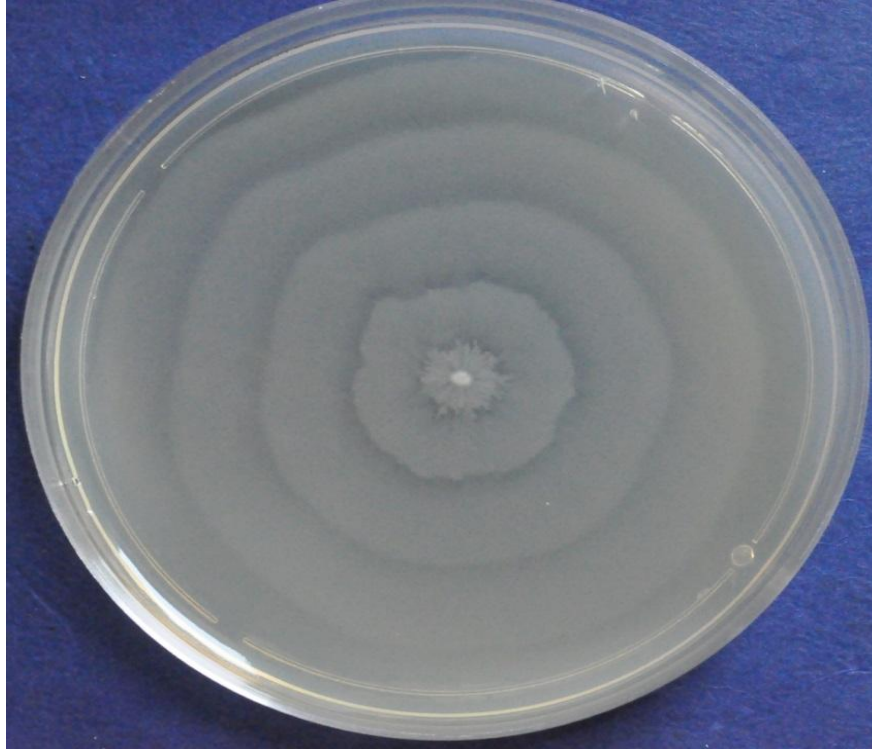
Temperatura optimă 37 grade C (limite 18 – 45 grade)



Nepretențioase nutritiv



Colonii S, apar după 18-24 h de incubare, 2 - 3 mm (după repicări pot apare colonii R), *Klebsiella* – colonii M (mucoide), *Proteus* – invadează suprafața mediului

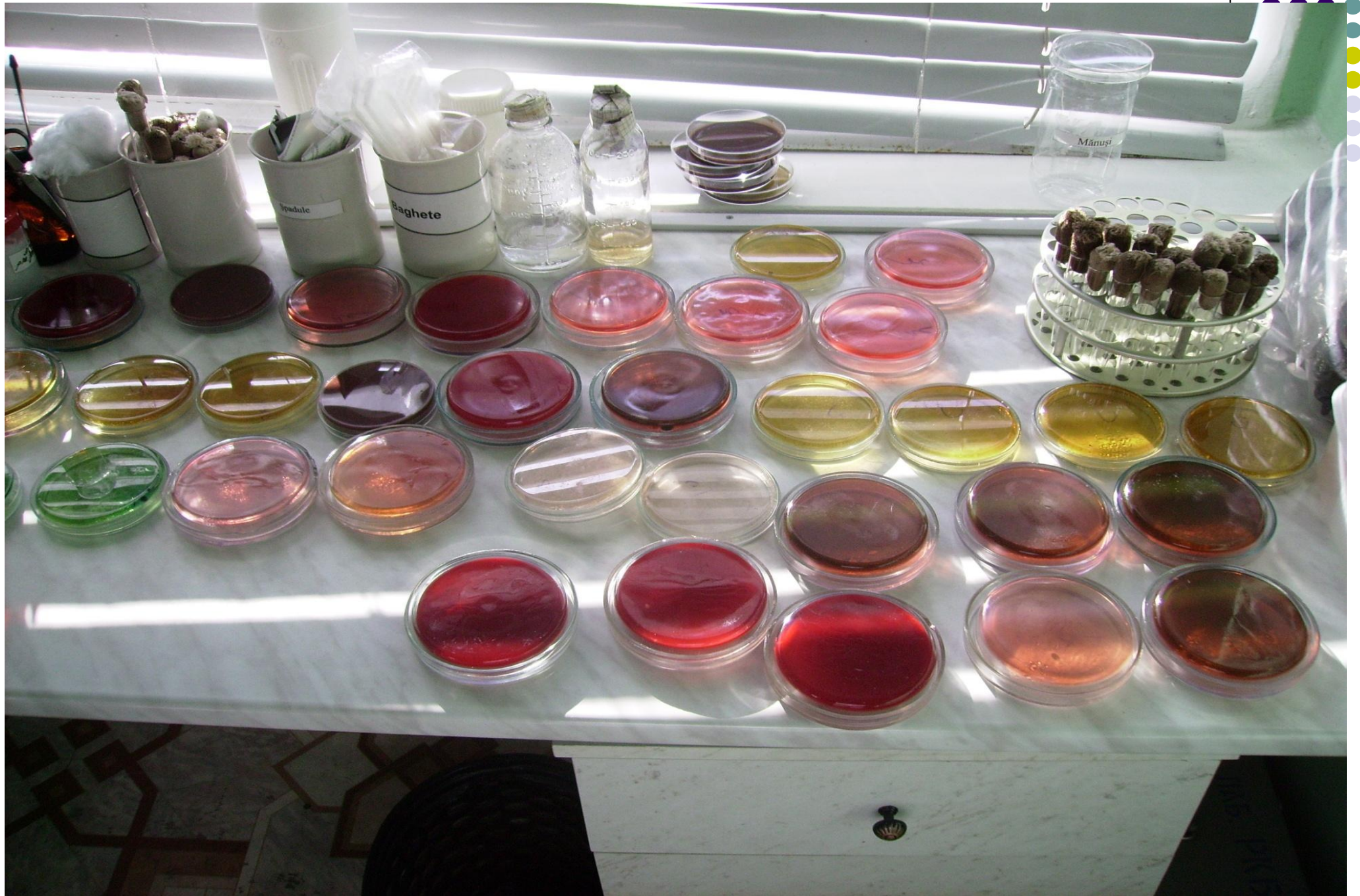


# MEDII DE CULTURĂ

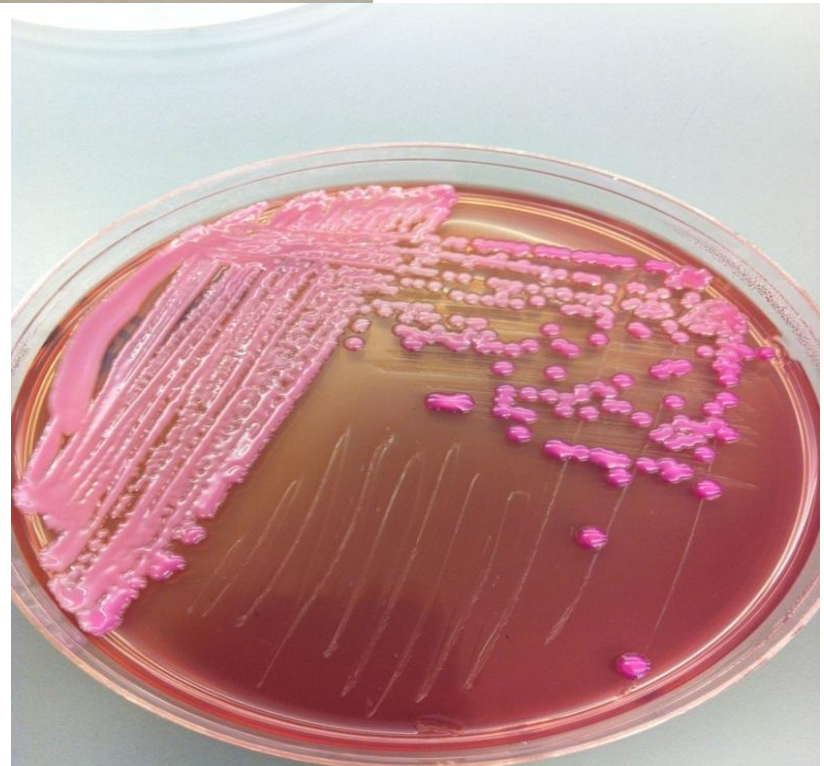
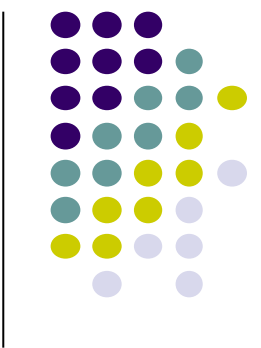


- **De transport:** glicerină 30%, soluție salină 3%, soluție tampon-fosfat
- **De îmbogățire** a bacteriilor patogene: Kauffman, Muller, bulion selenit, etc
- **Diferențial-diagnostice:**
  - De izolare a culturii pure***
    - **Mediile ENDO, LEVIN, PLOSKIREV, SS, MacConkey**  
Compoziția: bază nutritivă, **lactoză**, indicator  
Coloniile **L+** : colorate; Coloniile **L-** : incolore  
(frecvent flora patogenă)
    - **Mediul Wilson-Blair** cu **sulfit de Bi** (*Salmonella* reduce sulfitul în sulfură de Bi – colonii negre pe mediul verde)



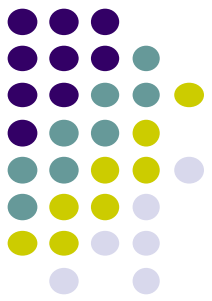




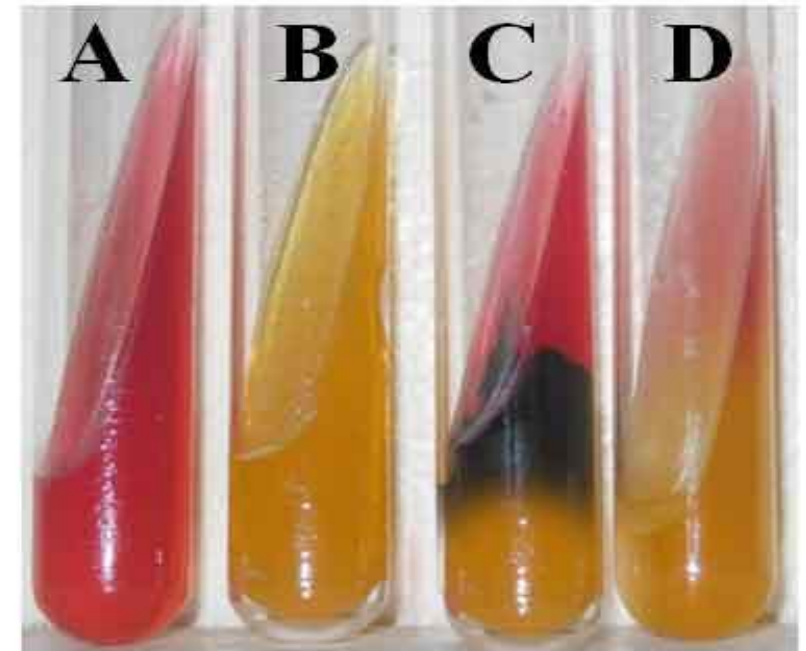
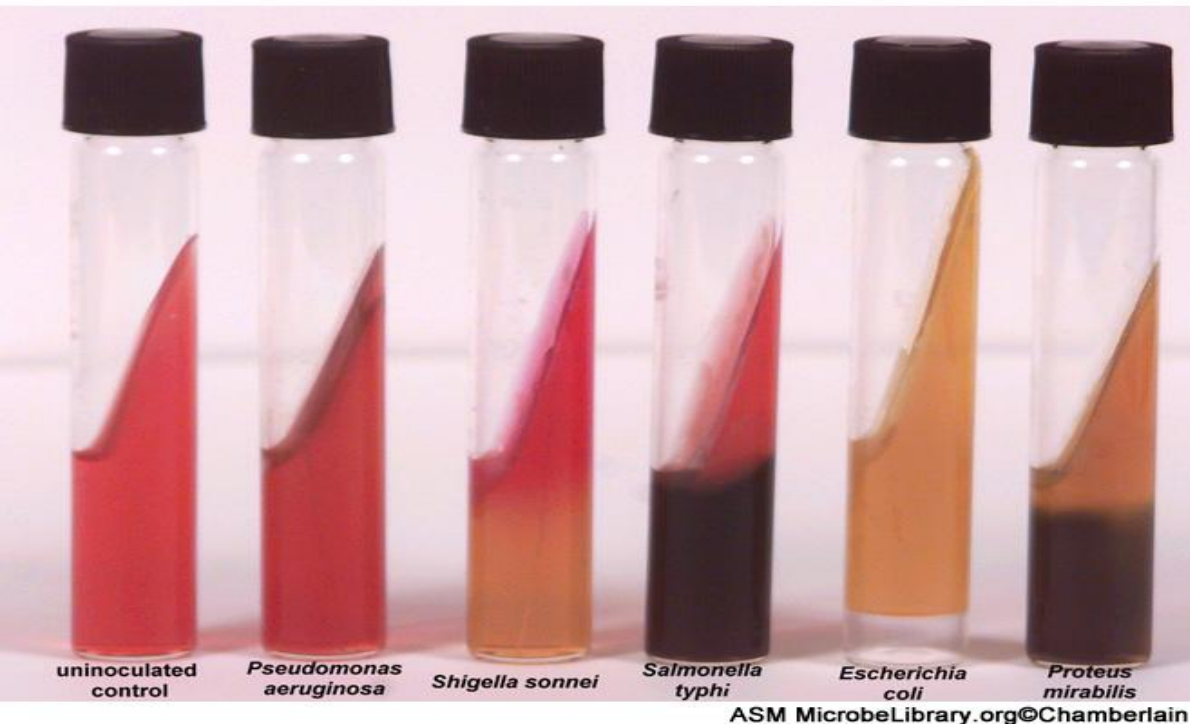




## II. De acumulare și identificare preliminară (medii multitest)



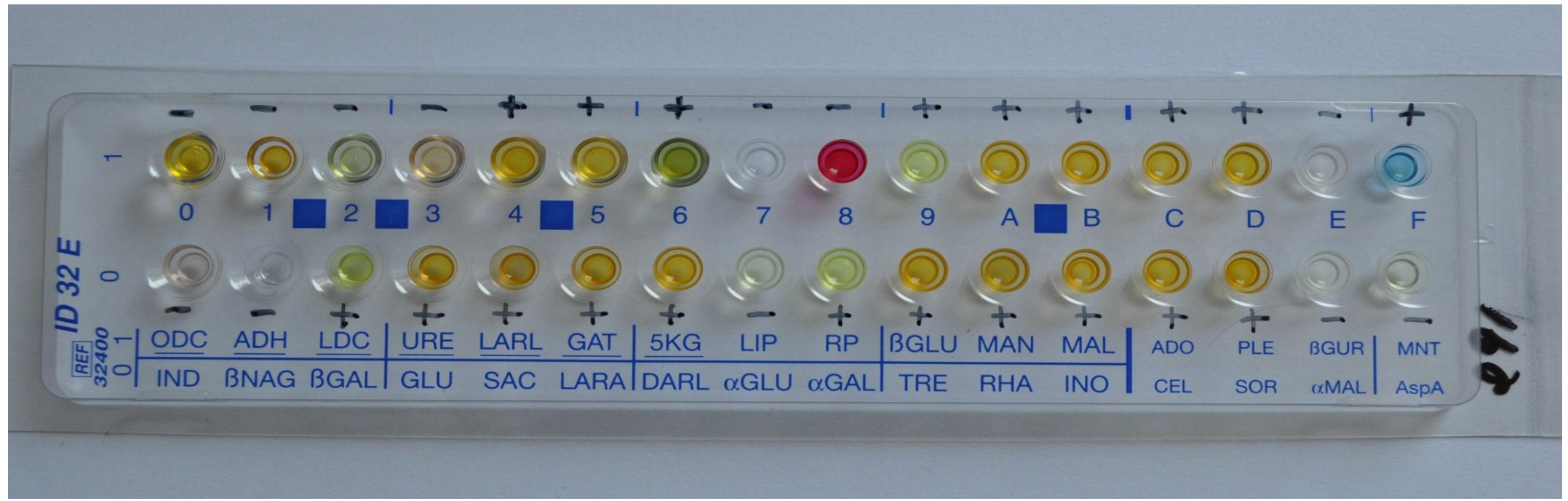
- 📌 Kligler (glucoză, lactoză, săruri de Fe, indicator)
- 📌 Olkenițki (glucoză, lactoză, zaharoză, uree, săruri de Fe, indicator)



- A) *Psuedomonas aeruginosa*: Gluc (-), Lac/Suc (-), H<sub>2</sub>S (-)  
B) *Escherichia coli*: Gluc (+), Lac/Suc (+), H<sub>2</sub>S (-)  
C) *Salmonella typhimurium*: Gluc (+), Lac/Suc (-), H<sub>2</sub>S (+)  
D) *Shigella boydii*: Gluc (+), Lac/Suc (-), H<sub>2</sub>S (-)



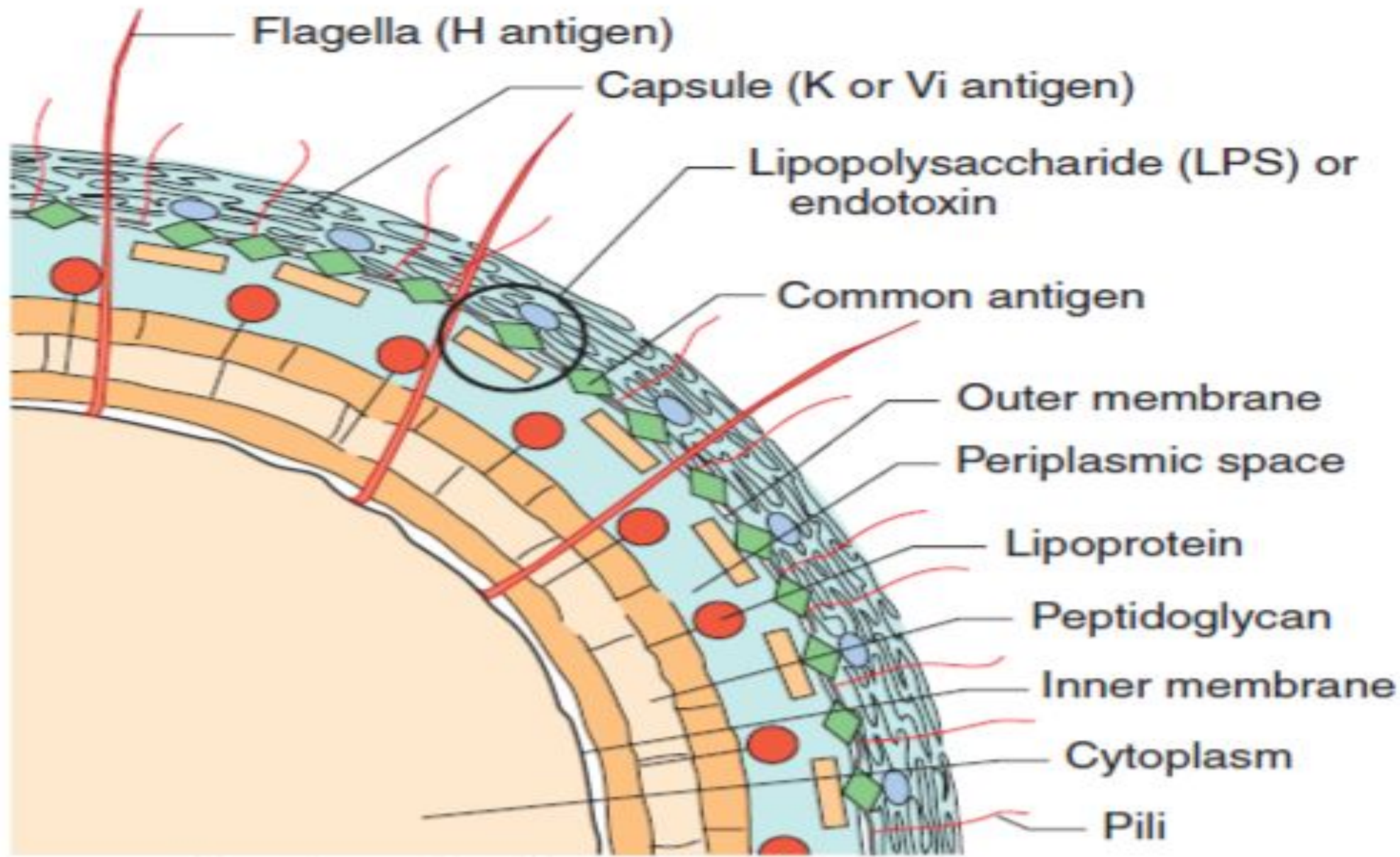
### III. *De identificare finală* (medii cu citrat de Na, malonat de Na, șirul Hiss, medii cu aminoacizi, gelatina, etc)








## CARACTERE ANTIGENICE

- **Ag O**, de perete, LPZ, termostabil și rezistent la alcool, sensibil la formol.
- **Ag H**, flagelar, proteic, termolabil și inactivat de alcool, rezistent la formol.
- **Ag K**, superficial, capsular, termovariabil. Maschează Ag O, determina inaglutinabilitate cu seruri anti-O. Variante – *L, A, B* la *E.coli*, *Vi* – la *Salmonella* și *Citrobacter*
- **Ag F**, fimbrial, termolabil, nespecific
- **ECA** – (**E**nterobacterial **C**ommon **A**ntigen) - antigen polizaharidic din peretele celular, comun familiei Enterobacteriaceae (interes taxonomic) – **Ag Kunitz**
- Antigenele O, K, H pot manifesta specificitate de gen, specie, grup, variantă/tip



-  — O polysaccharide
-  — Polysaccharide core (common antigen)
-  — Lipid A (endotoxin)

# GENUL SHIGELLA. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL DIZENTERIEI



- Shigelele – strict umane. Cauzează infecții intestinale - șigeloze, cea mai gravă formă–dizenteria bacteriană.
- 80-165 mln cazuri anual, 75 -600 mii de decese

**Clasificarea genului Shigella** (biochimică și antigenică):

A – *Shigella dysenteriae* (15 s/v, 12 b/v) **Manitol -**

B – *Shigella flexneri* (6 s/v, 14 ss/v, 23 b/v)

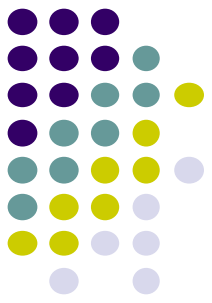
C – *Shigella boydii* (23 s/v)

D – *Shigella sonnei* (1 s/v, 7 b/v)

Serogrupele B, C, D sunt manitol +

Descoperite in 1898 de Kiyoshi Shiga

# CARACTERE MORFOBIOLOGICE



- Enterobacteriaceea tipice, imobile, lactozo-negative (colonii incolore pe medii DD)
- **Teste primare** - scindează glucoza până la acizi (testul MR+), celelalte teste primare sunt negative.





# FACTORI DE PATOGENITATE



Factori de adeziune la mucoasa colonului (fimbrii, LPZ)



Sistem de secretie tipul III (“seringa”)



Microcapsula (antifagocitar)

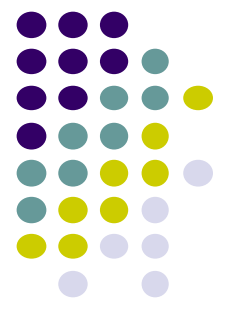
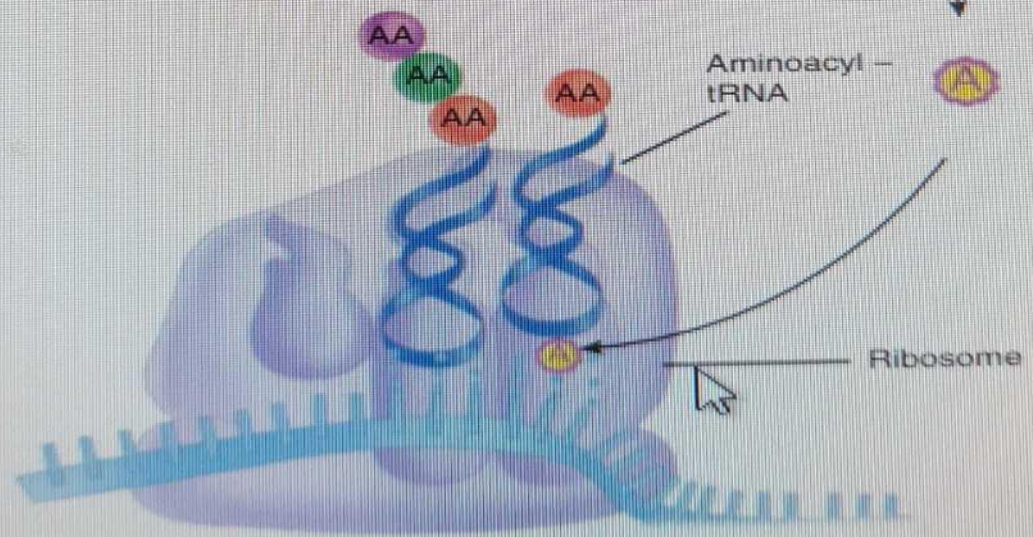
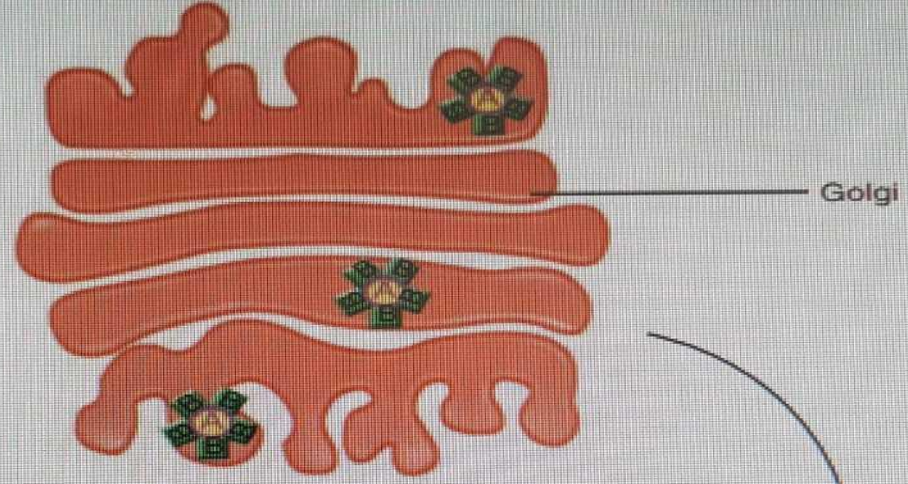
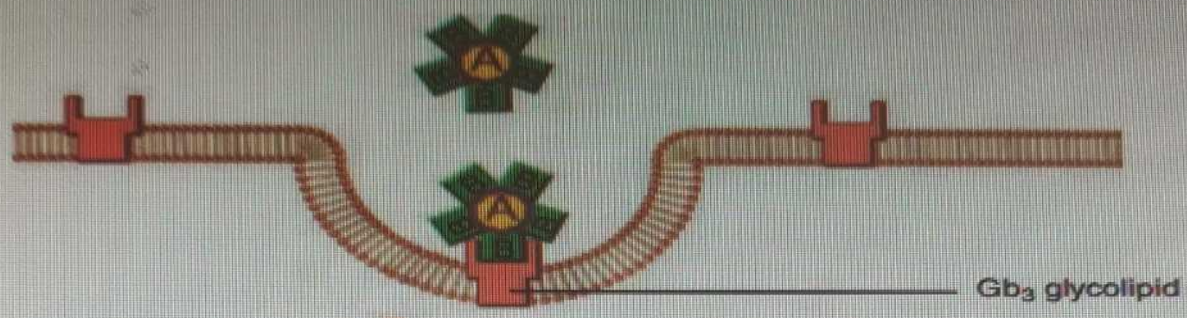


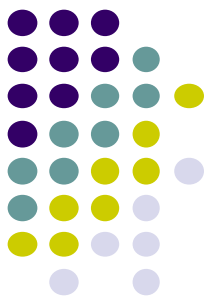
Factori de penetrare și multiplicare intracelulară



Toxine:

1. **Toxina Shiga**, de origine cromosomală, elaborată de *S.dysenteriae 1*. Inhiba sinteza proteinelor in celula gazda. Manifesta activitate citotoxică (neurotoxică, enterotoxică, etc).
2. **Citotoxine** (Shiga-like toxine (SLT), verotoxine), codificate de bacteriofagi. Efect similar cu cel al toxinei Shiga.
3. **Endotoxina**





**Structura antigenică: Ag O și K cu specificitate de gen, specie, subspecie, variantă**

**Rezistența în mediul extern:**

*S.dysenteriae* - foarte sensibilă (1-2 ore)

*S.flexneri* – persistă 1-3 săptămâni în apă, 2 luni în lactate

*S.sonnei* – persistă și se multiplică în lactate

# PATOGENEZA DIZENTERIEI BACTERIENE

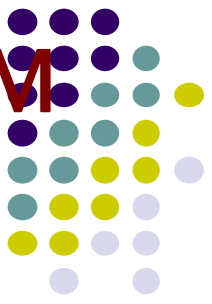


- **Sursa de infecție:** bolnav, reconvalescent, purtător
- **Transmiterea fecal-orală:**
  - 📧 Alimentar (alimente, apă)
  - 📧 Contact direct (mâini murdare)

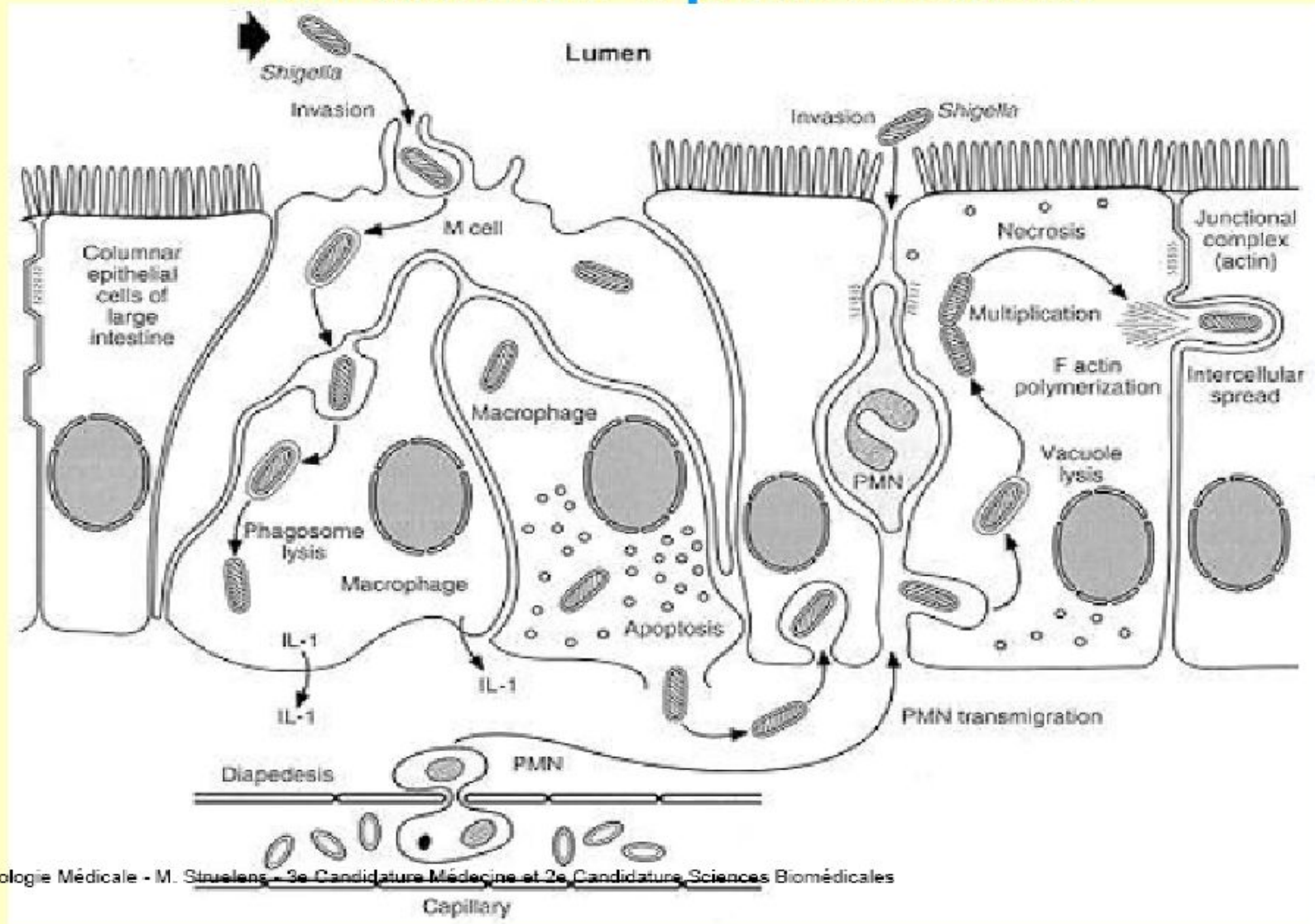
Doza infectantă:  $10-10^2$  bacterii

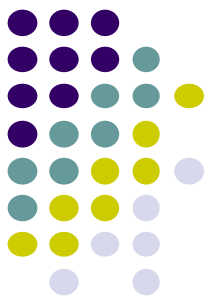
Bacteriile afectează intestinul gros. Celulele epiteliale normale sunt rezistente la infecția cu *Shigella* spp.

- In faza initiala *Shigella* este captata de **celulele M** din placile Peyer. Dupa transcitoza epiteliului intestinal bacteria este eliberata intr-o vacuola care ulterior este captata de macrofage. *Shigella* evita distrugerea prin initierea rapida a apoptozei macrofagelor, determinand eliminarea citokinelor proinflamatoare (IL1, IL18).
- *Shigella* eliberata din macrofage invadeaza celulele epiteliale prin membrana bazo-laterala (macropinocitoză dirijată, asigurată de un grup de proteine – **Ipa** (*invadind plasmid antigens*), injectate prin sistemul de secretie III), ulterior produce liza membranei vacuolei si se multiplica in citoplasma enterocitelor.



# Shigella: Invasion épithéliale



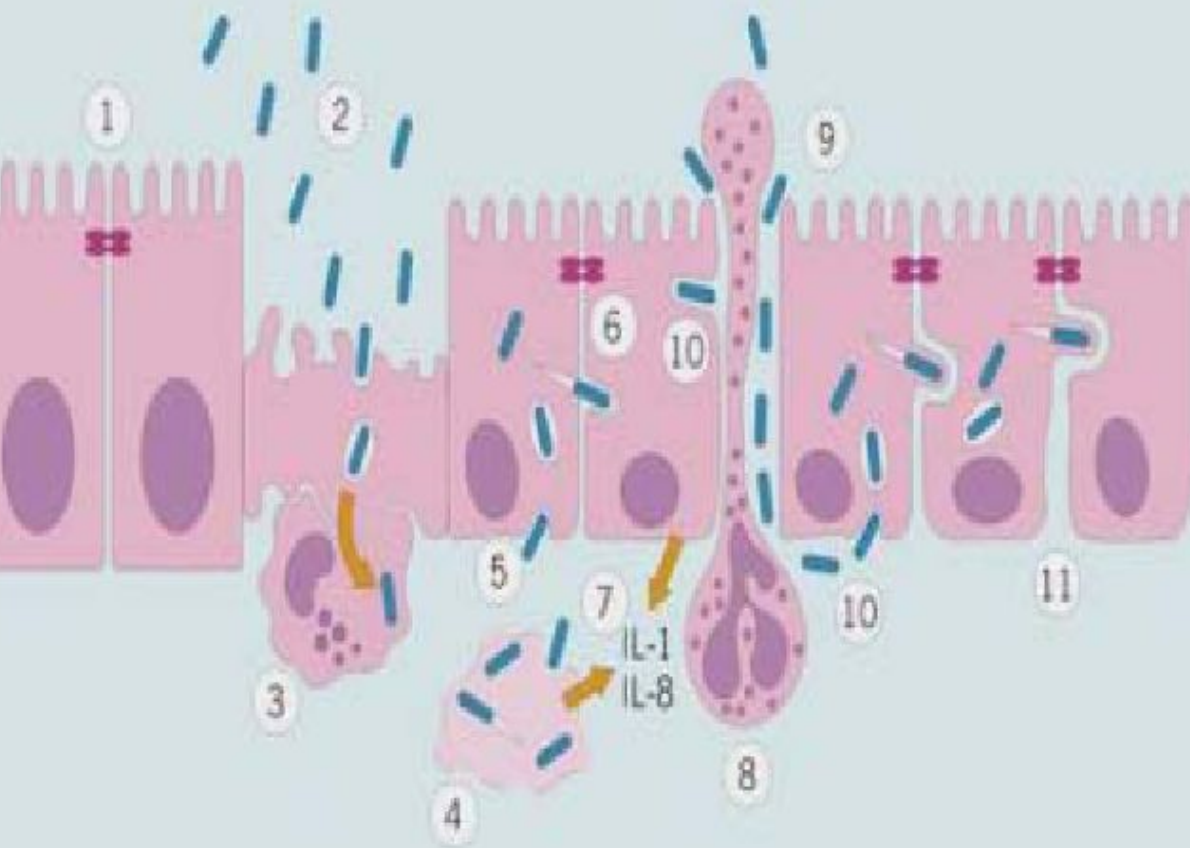


Bacteriile se multiplică și se propagă intra- și intercelular grație polimerizării actinei la un pol al celulei (caracter determinat plasmidic) cauzând distrugerea enterocitelor, ulcerații.

Citokinele eliberate de macrofage și celulele epiteliale determina o recrutare masivă a PMN un loc al infecției, ceea ce duce la distrugerea integrității epiteliului și facilitează invazia directă a submucoasei, evitând celulele M. Astfel, moartea macrofagelor, distrugerea stratului epitelial, influxul masiv al PMN determina inflamația fibrinoasă intensă a colonului, micro-abcese și ulcerații, cu apariția mucusului, puroiului și sângelui în materiile fecale

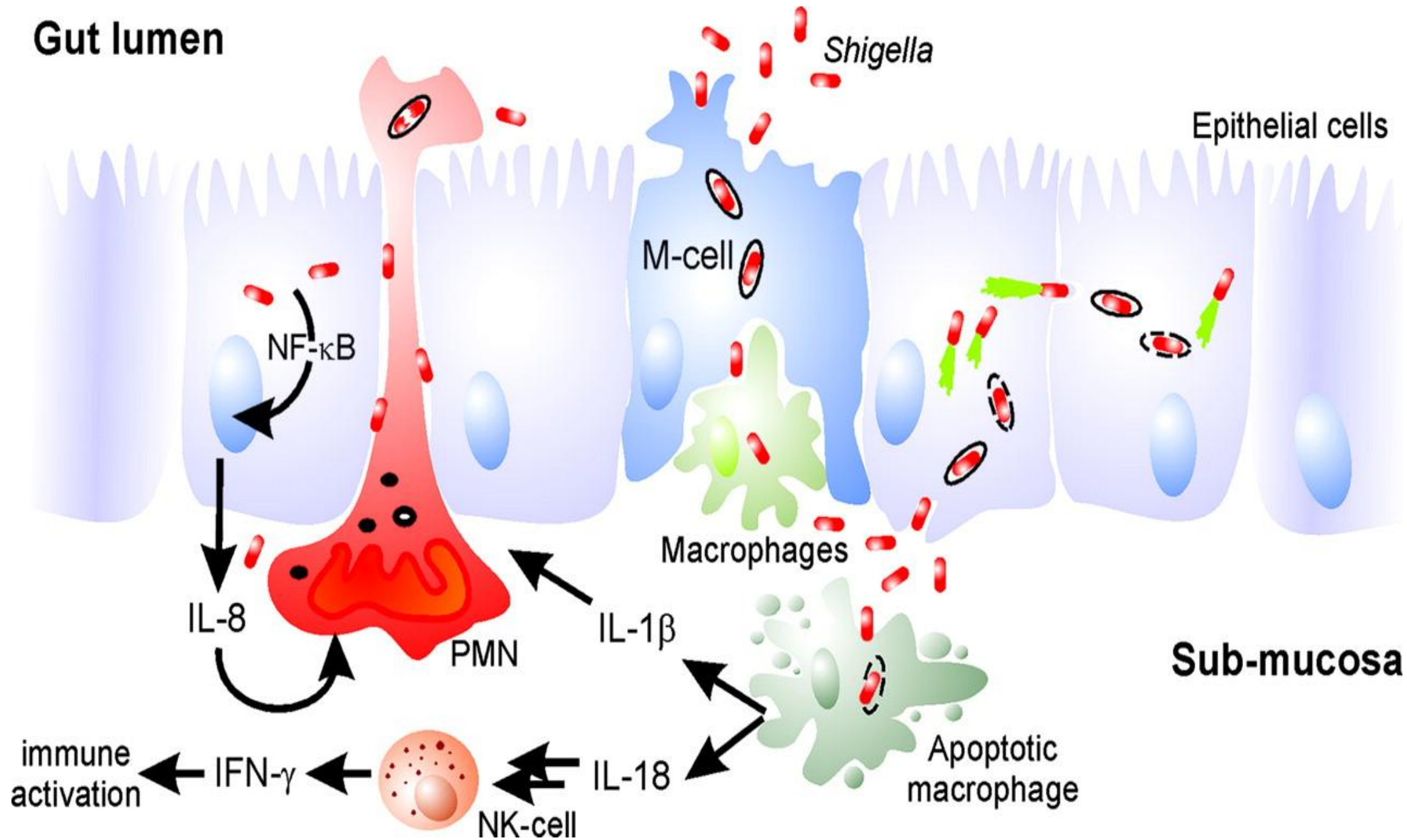


# Invasion de la muqueuse intestinale par *Shigella*



- 1 Normal intestinal epithelial cells with tight junctions – resistant to infection with *Shigella* spp.
- 2 Bacterial uptake through M cells
- 3 Invasion of macrophages
- 4 Macrophage lysis, release of bacteria and cytokines
- 5 Invasion of epithelial cells at basolateral membrane
- 6 Cell-to-cell invasion initiated
- 7 Production of cytokines
- 8 Attraction of neutrophils and transmigration through the epithelial layer
- 9 Massive translocation of bacteria through disrupted tight junction
- 10 Further invasion at basolateral membranes
- 11 Continuing cell-to-cell invasion and extension of focal lesion

**Gut lumen**



*Shigella*

Epithelial cells

M-cell

NF- $\kappa$ B

IL-8

PMN

Macrophages

IL-1 $\beta$

Sub-mucosa

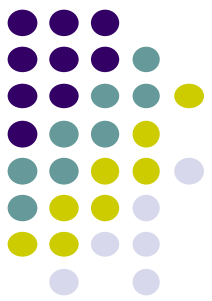
Apoptotic macrophage

immune activation

IFN- $\gamma$

NK-cell

IL-18



**Perioada de incubatie – 2 - 4 zile**

**Semne clinice – febră, dureri abdominale, tenesme (spasme rectale), scaune lichide mucopurulente-sanguinolente frecvente.**

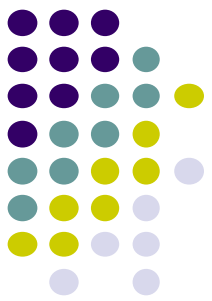
**Vindecarea în 2-5 zile (clinică, apoi microbiologică).**

**Forme cronice sau portaj sunt posibile.**

# DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL DIZENTERIEI



- **Prelevate:** probe de scaun (elementele muco-sangvinolente, purulente), apa, alimente, lavaje de pe suprafețe
- **Metode de diagnostic**
  1. Examenul microscopic – RIF
  2. Examenul bacteriologic
    - I. **Izolarea culturii pure** pe medii DD (Endo, Levin, Ploskirev, SS) sau **Îmbogățirea** shigelelor în bulion selenit








II. Coloniile lactozo-negative sunt repicate pe mediile Olkenițki, Kligler pentru **acumularea culturii pure și identificare preliminară**

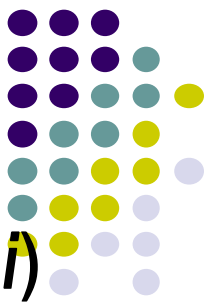
(lactoza/zaharoza -, glucoza A, H<sub>2</sub>S -)

III. **Identificarea definitivă a culturii pure**

- Caractere morfotinctoriale

-  Caractere de cultură
-  Caractere biochimice (teste primare, secundare)
-  Caractere antigenice (seroidentificarea prin RA pe lamă cu seruri imune anti-*Shigella* poli- și monovalente)
-  Fagoidentificarea
-  Antibiograma

IV. **Analiza rezultatelor și formularea răspunsului**



### 3. Diagnosticul serologic (din a 5-7 zi de boală)

- RA, RHAI - adulți 1:400 (*S.flexneri*), 1:200 (*S.sonnei*)

copii 1:100

coproanticorpi (slg A) – 1:80

#### ELISA

**Imunitate:** specifică de tip, 1-2 ani, umorală (slgA)

**Profilaxie:** vaccinuri ribosomale, inactivate, atenuate (imunitate de scurtă durată)

**Tratament:** antibiotice (tetraciclină, ampicilina, etc), trimetoprim, sulfamide, eubiotice, bacteriofagi, vaccin inactivat (dizenteria cronică)