Диареегенная кишечная палочка

Презентацию подготовила
старший преподаватель кафедры микробиологии и вирусологии МИ РУДН
Жигунова Анна Владимировна

http://antimicrobialresistance.dk/CustomerData/Files/Folders/6-pdf-protocols/69_33-20-e-coli-methods.pdf
http://rospotrebnadzor.ru/documents/details.php?ELEMENT_ID=5076
https://www.cdc.gov/ecoli/index.html
https://ecdc.europa.eu/en/escherichia-coli-ecoli
https://www.nhsinform.scot/illnesses-and-conditions/infections-and-poisoning/escherichia-coli-e-coli-o157

Классификация

патотип – бактерии одного рода и вида, которые отличаются друг от друга по факторам вирулентности

1. Энтеропатогенная *E.coli* (Enteropathogenic *E.coli* = **EPEC**)
2. Шига токсинпродуцирующая *E.coli* (Shiga toxin-producing E.coli = **STEC**, синоним Verocytotoxigenic *E.coli* = **VTEC**)
3. Энтероинвазивная *E.coli* (Shigella/Enteroinvasive *E.coli* = **EIEC**)
4. Энтеротоксигенная *E.coli* (Enterotoxigenic *E.coli* = **ETEC**)
5. Энтероаггрегативная *E.coli* (Enteroaggregative *E.coli* = **EAggEC**)
6. Диффузно-адгерентная *E.coli* (Diffusely adherent *E.coli* = **DAEC**)
7. Адгерентно-инвазивная *E.coli* (Adherent invasive *E.coli* = **AIEC**)

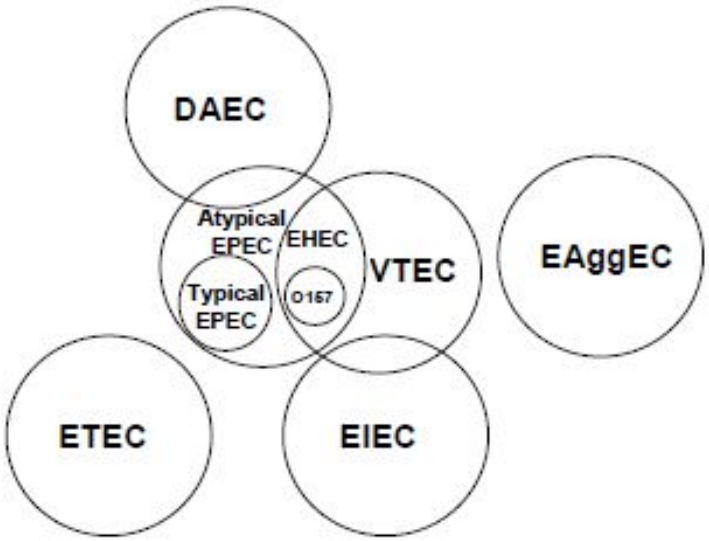


Figure 1: Venn diagram illustrating the relationships between *E. coli* pathotypes causing diarrhoeal disease (modified from Donnenberg, 2002)

Общая характеристика, выделение и типирование E.coli (I)

- Грам «-»
- оксидаза-отрицательная
- нетребовательна к питательным средам, может расти в аэробных и анаэробных условиях, при 37°С
- подвижна - перитрих (встречаются неподвижные штаммы)
- Некоторые штаммы, особенно возбудители внекишечных инфекций, имеют полисахаридную капсулу
- Лактозопозитивна (за исключением представителей EIEC, которые являются лактозонегативными на дифференциально-диагностических средах)

Общая характеристика, выделение и типирование E.coli (II)

- Классический метод серотипирования включает идентификацию О-соматического (полисахарид) антигена и Н-жгутикового поверхностного антигена. На основании различий по О-антигену выделяют *серогруппы*
- Антигенные различия внутри вида бактерий в зависимости от комбинации О-антигена, Н-антигена и, иногда, К-антигена позволяют выделить *серотипы*
- В настоящий момент известно 174 О-антигена *E.coli* и 53 Н-антигена *E.coli*, в то же время, только небольшое количество О:Н комбинаций ассоциированы с заболеваниями

Общая характеристика, выделение и типирование E.coli (III)

- Большинство патогенных *E.coli* - внеклеточные паразиты, но EIEC внутриклеточный патоген, способный внедряться и размножаться внутри эпителиальных клеток и макрофагов. Другие *E.coli* могут проникать в эпителиальные клетки в небольшом количестве, но не могут там размножаться
- Патогенные *E.coli* имеют специфические факторы патогенности, которые позволяют им колонизировать тонкий кишечник и мочевыводящие пути

Факторы патогенности

Факторы адгезии

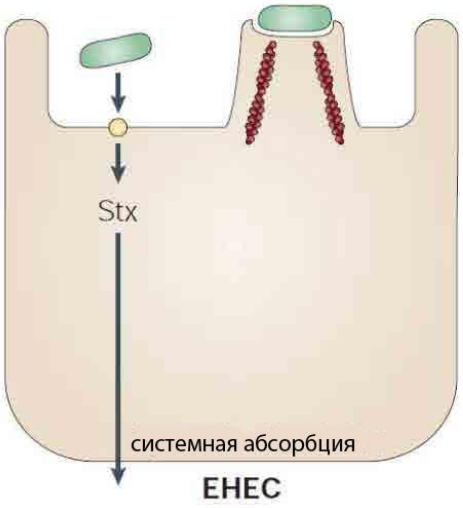
- фимбрии (пили)
- фимбриллы
- наружные мембранные белки (интимин EHEC)
- не фимбриальные адгезины

Токсины

- термолабильный энтеротоксин (heat-labile enterotoxin (LT))
- термостабильный энтеротоксин (heat-stabile enterotoxin (ST))
- Шига-токсин (Shiga toxin (Stx), продуцируют EHEC. Токсин нарушает синтез белка и вызывает гибель эпителиальных клеток и эндотелиоцитов
- Pic (протеаза с муциназной активностью) (некоторые EAEC)
- шигелленый энтеротоксин 1 (Shigela enterotoxin 1 = ShET1), энтероаггрегативный *E.coli* ST (EAST1) (некоторые EAEC)

Shiga toxin-producing E.coli (STEC)

- причина кровавой диареи, гемолитико-уремического синдрома (ОПН + микроангиопатическая гемолитичская анемия + тромбоцитопения)
- Основной фактор патогенности (кодируются лямбда фагом) – Шига-токсин (Stx, известен также как вероцитотоксин (VT))
- Энтерогеморрагическая *E.coli* (enterohemorrhagic = EHEC) является подтипом STEC и впервые описана в связи геморрагическим колитом. Самая значимая серогруппа O157:H7. По клинической картине заболевание протекает как шигеллёз, но по генотипическим и фенотипическим характеристикам выделенная чистая культура *E.coli* была идентифицирована как STEC
- 6 серотипов EHEC: O26, O45, O103, O111, O121, O145, так называемая «большая шестерка»



Эпидемиология STEC

- Резервуар: жвачные животные, особенно крупный рогатый скот
- Механизм передачи инфекции: фекально-оральный
- Пути передачи: алимментарный (непастеризованное молоко, сыры, фруктовые соки, салат, шпинат, грибы, колбаса); водный (купание в зараженных водоемах, питье инфицированной воды); контактный (контакт с фекалиями животных); возможна передача инфекции от человека к человеку
- Инфицирующая доза 10 – 100 клеток

Клиническая картина STEC

- разнообразна: от легкой водянистой диареи до кровавой диареи (геморрагический колит) с развитием гемолитико-уремического синдрома и тромбоцитопенической пурпуры.
- Инкубационный период 1-8 дней (в среднем 3-4 дня). Начало характеризуется лихорадкой, болью в животе, рвота встречается у половины пациентов. Через 1-2 дня стул становится кровавым, у 10% пациентов моложе 10 лет или у старшего поколения заболевание прогрессирует с развитием гемолитико-уремического синдрома.
- Гемолитико-уремический синдром характеризуется триадой признаков: анемия, тромбоцитопения, почечная недостаточность. Начальные симптомы включают олигурию, вплоть до анурии и отека.

Патогенез STEC

- STEC способна переживать низкие значения pH в желудочно-кишечном тракте. Вызывая гемолитико-уремический синдром в результате Шига токсин связывается с клетками почек, вызывая гемолитико-уремический синдром.
- Шига-токсин делится на два типа, оба типа кодирует профаг. Во время стресса бактериальной клетки фаг несущий ген «Шига-токсин» становится «литическим». Использование при лечении STEC-инфекции фторхинолонов и триметоприма вызывает увеличение продукции Stx2, в то время как азитромицин не приводит к реализации литического цикла фага.
- Существует две формы Шига-токсина, не индуцирующих в организме перекрестного иммунитета.

Механизм действия Шига-токсина.

- Шига-токсин связывается с глоботриаосилцерамидом (globotriaosylceramide = $Gb3^{+}$) на поверхности эндотелиальных клеток, затем он интернализируется и переносится через аппарат Гольджи и эндоплазматический ретикулум в цитоплазму клетки, ингибируя синтез белка с последующей гибелью клетки. Во время инфекции STEC медиаторы воспаления (фактор некроза опухоли, ИЛ-1), а так же липополисахарид повышает число церамидных рецепторов на поверхности эукариотических клеток, увеличивая связывание Stx токсина с этими клетками.
- Механизм транспорта Шига-токсина от полости кишечника через эпителий кишечника неизвестен. Предполагается, что STEC может переноситься с помощью М-клеток кишечника, выживая в макрофагах, что, возможно, приводит к освобождению Шига-токсина в кровеносную систему, и доставку его к клеткам-мишеням.

Идентификация STEC

- количество STEC в микрофлоре испражнений может быть низким, часто < 1% (поэтому выделение STEC обязательно включает посев на среды обогащения)

Иммуномагнитное разделение (Immunomagnetic separartion = IMS)

- Иммуномагнитные частицы покрыты поликлональными антителами, специфичными к основным серогруппам STEC (O157, O26, O111, O103, O145). Метод полностью автоматизирован и используется для выделения STEC из сред обогащения.
- Использование метода иммуномагнитного разделения является «золотым стандартом» выделения E.coli O157 перед посевом на плотные питательным среды.
- Для других STEC метод не стандартизован.

Культивирование на плотных питательных средах

- Неспособность большинства E.coli O157 ферментировать сорбитол позволяет использовать среду сорбитол МакКонки агар (SMAC). Цексифим и теллурит калия могут быть добавлены в SMAC (CT-CMAC) повышая селективность сильно загрязненных проб. E.coli O157 образуют бесцветные колонии, отличаясь от STEC других серогрупп и другой микрофлоры.
- Не смотря на то, что не-сорбитол ферментирующие E.coli O157 доминируют, сорбитол-ферментирующие E.coli O157 (неподвижные) являются причиной гемолитико-уремического синдрома в странах Европы и в Австралии. Сорбитол-ферментирующие E.coli O157 бактерии растут на среде SMAC в виде цветных колоний и теллурит калия (CT-SMAC) может ингибировать рост этих микроорганизмов. Эти микроорганизмы являются β-глюкуронидаза негативны (GUD), что является дополнительным методом для идентификации этих бактерий

Идентификация STEC

Иммунологические методы

- Большинство коммерческих наборов направлено на выделение O157 STEC. Используются иммуноферментный анализ (ИФА).
- Определение антител в сыворотке крови пациента к липополисахариду STEC методами ИФА и иммуноблоттинга.

Вероцитотоксичный метод

- Способность STEC синтезировать Stx может быть обнаружена по способности этих цитотоксинов индуцировать цитопатический эффект на монослое клеток Vero, который наблюдается через 24 ч после инкубации.
- Реакции латекс агглютинации позволяют определить Stx в фекалиях.

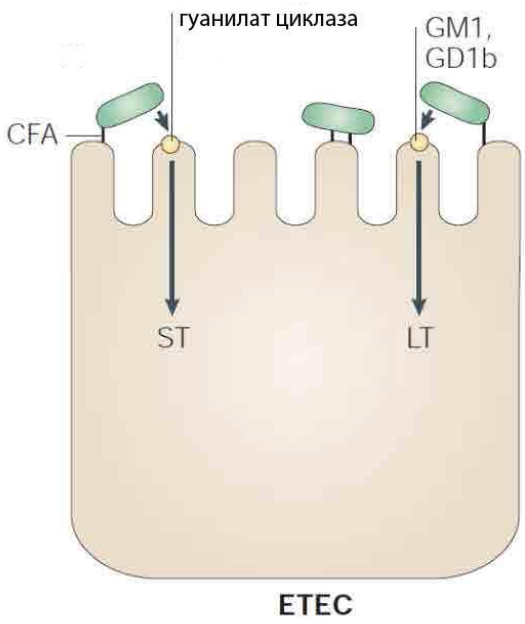
Молекулярные методы

- Полимеразная цепная реакция (ПЦР) позволяет определить гены, кодирующие факторы вирулентности.

- **Лечение STEC.** Обычно инфекция, вызванная STEC, самостоятельно проходит в течение 7 дней. В настоящий момент нет путей для предотвращения развития гемолитико-уремического синдрома во время инфекции STEC.
- Молекулы, секретируемые *Lactobacillus acidophlus* способны ингибировать адгезию к эпителиальным клеткам STEC O157:H7. Применение *Bifidobacterium* spp. и *Lactobacterium* spp. также показало способность ингибировать рост STEC in vitro
- **Специфическая профилактика STEC** не разработана

Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC)

- Самая частая причина диареи путешественников
- Продуцирует термолабильный (LT) и/или термостабильный (ST) энтеротоксины
- LT токсин кодируется хромосомой, ST кодируется плазмидой
- LT токсин подобен токсину V.cholerae
- Факторы адгезии - фимбрии



GM1, GD1b – поверхностные клеточные ганглиозды, с которыми связывается B-субъединица токсина

Эпидемиология ETEC

- Болеют чаще дети < 2 лет и путешественники, посещающие развивающиеся страны.
- Источник инфекции: больной человек и бессимптомный бактерионоситель.
- Механизм передачи: фекально-оральный.
- Пути передачи: водный, алиментарный.
- Инфицирующая доза 10^6 – 10^8 клеток.

Патогенез ETEC

- ETEC адгезируется на поверхности эпителиоцитов с помощью пилей и фимбрилл (кодируются плазмидой). Далее ETEC секретируют экзотоксины (LT и/или ST). В-компонент LT токсина, состоящий из 5 частей, связывается с ганглиозидом GM1 и доставляет А-субъединицу в клетку. LT имеет АДФ-рибозил трансферазную активность, в результате которой повышается уровень активность аденилатциклазы, что приводит к повышению уровня цАМФ, повышению секреции Cl^- эпителиоцитами, что и определяет диарею.
- ST токсин включает два класса STa и STb, отличающиеся структурой и механизмом действия. У человека встречается только STa токсин. STa связывается с гуанилатциклазой, повышая её активность, что приводит к увеличению уровня цГМФ и повышению секреции.

Клиническая картина ETEC

- Водянистая диарея (от легкой до тяжелой формы), головная боль, лихорадка, боль в животе, тошнота, рвота.

Идентификация ETEC

Традиционно ETEC определяют по продукции энтеротоксинов LT/ST

Определение ST токсина проводят, используя петлю тонкой кишки кролика (биологический метод)

LT определяют:

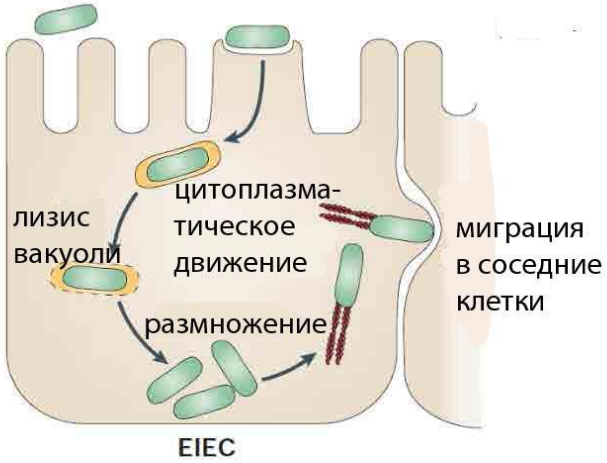
- в монослое mouse adrenal cells (Y1), Chinese hamster ovary (CHO), African green monkey kidney (Vero). Токсин присутствует в супернатанте и оказывает цитотоксичное действие на клетки
- Реакция преципитациии (Biken тест) кроличьи АТ к LT добавляют в агар на котором будут культивировать чистую культуру. В случае, если культура секретирует LT будут видны линии преципитации

- Определение как ST, так и LT возможно, используя методы ИФА и ПЦР.

- **Лечение.** ETEC диарея самостоятельно излечивается, необходима оральная регидратация, в тяжелых случаях показана парентеральная регидратация. Назначение антибиотиков нецелесообразно.
- **Специфическая профилактика.** Ducoral – оральная, инактивированная цельноклеточная вакцина, содержащая рекомбинантный холерный токсин. Вакцина рекомендована для путешественников, планирующих посетить страны с высокой заболеваемостью ETEC.

Enteroinvasive *E.coli* = EIEC

- EIEC генетически, биохимически и патогенетически близко связана с бактериями рода *Shigella*. EIEC вызывает воспаление в толстом кишечнике, напоминающее бактериальную дизентерию, но большая часть случаев протекает с водянистой диареей.
- Признаками EIEC является способность внедряться в эпителиоциты и распространяться от клетки к клетке.
- Факторы вирулентности кодируются плазмидой. Подобная плазмида присутствует у Shigella.
- EIEC насчитывает 21 серотип, которые определяют по О- и Н-антигену. В ряде случаев О-антиген EIEC по химической природе близок к О-антигену *Shigell spp.,* обуславливая перекрёстные реакции.



Эпидемиология EIEC

- Вспышки заболевания связаны с употреблением в пищу гамбургеров и непастеризованного молока.
- Механизм передачи – фекально-оральный.
- Пути передачи инфекции: водный, алиментарный, возможна передача через мух.

Патогенез EIEC

- Ранняя стадия характеризуется проникновение EIEC в эпителиоциты толстого кишечника, с последующим лизисом эндоцитозной вакуоли, внутриклеточным размножением, прямым перемещением через цитоплазму и распространением на прилегающие эпителиоциты. Движение через цитоплазму опосредовано концентрированием клеточного актина на одном полюсе бактерии.
- EIEC способна индуцировать апоптоз макрофагов.

Клиническая картина EIEC

Заболевание, вызванное EIEC, характеризуется развитием водянистой диареи, но встречаются случаи с клинической картиной шигеллёза (лихорадка, боль в животе, тенезмы, скудный стул с прожилками крови и слизи).

Идентификация EIEC

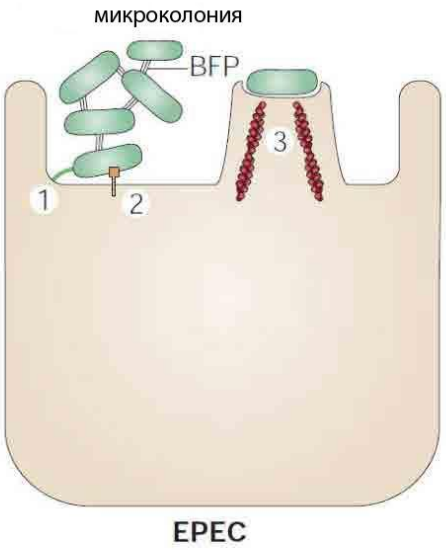
- EIEC генетически, биохимически и патогенетически близка к *Shigella* spp.
- Штаммы EIEC сложно дифференцировать с *Shigella spp*..
- Инвазивный потенциал EIEC определяют, используя тест Серени (Sereny) – кератоконъюнктивальная проба на морских свинках или на клетках Hela (способность образовывать бляшки коррелирует с вирулентными характеристиками этих бактерий).
- Молекулярно-генетические методы исследования (ПЦР) позволяют определить патотип-специфические генетические маркеры.
- Идентификация выделенной чистой культуры возможна в реакции слайд-агглютинаци.

Лечение EIEC. Легкая и средняя степень течения заболевания требует оральной регидратации. В случае тяжелого заболевания рекомендована антибиотикотерапия (азитромицин, цефалоспорины 3-го поколения, фторхинолоны).

Специфическая профилактика EIEC не разработана

Enteropathogenic *E. coli* (EPEC)

- Патогенность связана с повреждением эпителиальных клеток
- Характерная гистологическая картина при инфекции, вызванной EPEC, носит название «attaching and effacing» (A/E) повреждения. Способность индуцировать A/E повреждение кодируется геном в островке патогенности (pathogenicity island = PAI), именуемый островком стирания энтероцитов (locus enterocyte effacement = LEE). LEE кодирует наружный белок интимин, который опосредует тесное прикрепление EPEC к эпителиальным клеткам. Интимин выполняет не только функцию лиганда для эпителиальных клеток, но и стимулирует Th1 иммунный ответ и гиперплазию крипт тонкого кишечника
- Диарея, вызванная EPEC НЕ связана с продукцией токсинов



BFP - bundle forming pilus, 1. начальная адгезия, 2. перемещение белка по III типу секреции, 3. формирование пьедестала

Эпидемиология EPEC

- Резервуар: крупный рогатый скот, куры, собаки, кролики, обезьяны
- Механизм передачи инфекции: фекально-оральный
- Пути передачи: водный, алиментарный
- Инфицирующая доза - 10^8 - 10^{10} клеток

Клиническая картина EPEC

- лихорадка
- рвота
- дегидратация у детей < 2 лет
- непереносимость коровьего молока
- плохой «ответ» на оральную регидратацию

Идентификация EPEC

- на идентификации факторов патогенности: A/E повреждение, используют микроскопию культуры клеток. При флюоресцентной окраске актина (fluorescent actin staining = FAS) используется флюоресцин изотиоцианат (fluorescin isothiocyonate = FITC) или родамин конъюгат фалоидин, которые флюоресцируют, показывая формирование пьедестала
- исследование адгезии на клетках HEp-2 и HeLa
- ПЦР
- ДНК - гибридизация

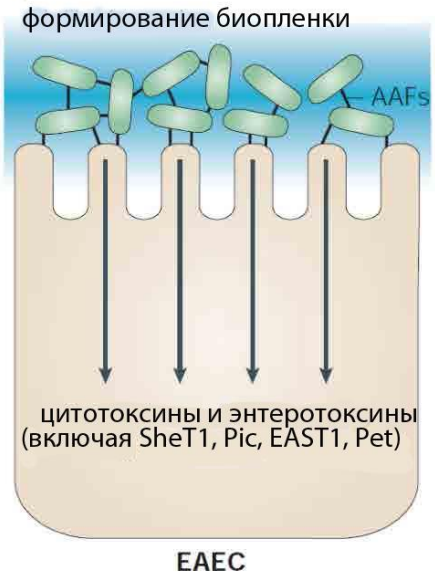
Лечение

- оральная регидратация
- персистирующая инфекция требует назначение антимикробных препаратов, с обязательным определением чувствительности

Специфическая профилактика не разработана

Enteroaggregative *E.coli* = EAggEC

- Характеризуется персистирующей диареей (> 14 дней)
- EAEC штаммы характеризуются повышением секреции слизи и формированием слизисто-бактериальной биоплёнки
- EAEC не синтезирует LT и ST, адгезия к HEp-2 известна как аутоаггрегация, при которой бактерии склеиваются друг с другом в форме сложенных кирпичей. Адгезия к клеткам HEp-2 обусловлена фимбриальными структурами, известными как аггрегативные адгерентные фимбрии (**aggregative adherence fimbriae (AAFs)**), которые связаны с Dr семейством адгезинов.
- Некоторые EAEC вырабатывает токсины: **Pic** (протеаза с муциназной активностью) и шигелленый энтеротоксин 1 (Shigela enterotoxin 1 = ShET1), присутствующий у большинства штаммов *Shigella flexneri* 2a. Действие **ShET1** не до конца понятно, может быть, он обуславливает диарею, которая сопровождает EAEC и шигеллезную инфекцию. Второй энтеротоксин, который присутствует у большинства EAEC – это энтероаггрегативный *E.coli* ST (**EAST1**).



Enteroaggregative *E. coli* (EAggEC)

- Вызывает острую и персистирующую диарею, особенно в развивающихся странах

Факторы патогенности не до конца изучены

- Факторы адгезии
- ST-подобный токсин (продуцируют НЕ все штаммы)

Лабораторная DS-ка EAggEC

- Адгезия к клеткам Hep-2

Эпидемиология EAggEC

- Болеют взрослые и дети, как в развивающихся странах, так и в развитых
- Источник инфекции больной человек и бессимптомный бактерионоситель
- Механизм передачи: фекально-оральный
- Пути передачи: водный, алиментарный (салаты, десерты, сальса)

Патогенез EAggEC

Адгезия к клеткам тонкого кишечника с помощью фимбриальных (AAF) и не фимбриальных адгезинов. Далее происходит продукция токсинов, с повреждение цитоскелета эпителиальных клеток, накопление цАМФ, с развитием водянистой диареи. Во время развития инфекции выделяется много IL-8, который приводит к рекрутингу лейкоцитов с дальнейшим развитием воспалительной диареи.

Клиническая картина EAggEC

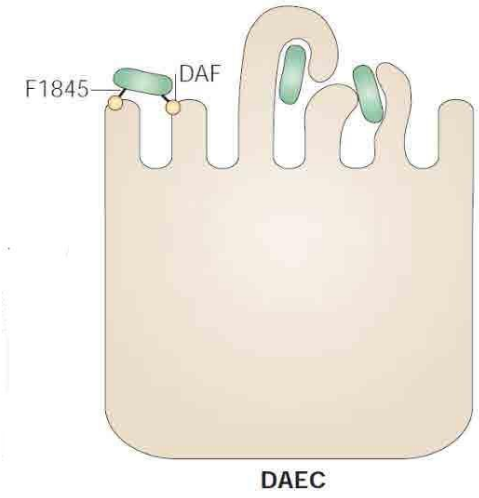
- Наблюдается водянистая секреторная диарея, часто со слизью, сопровождающаяся небольшой лихорадкой, тошнотой, рвотой, болями в животе, иногда с кровью. У добровольцев, заражённых EAggEC наблюдается слизистая диарея, небольшого объёма, без скрытой крови или лейкоцитов, с отсутствием лихорадки

Идентификация EAggEC

- «Золотым стандартом» идентификации EAEC является заражение культуры клеток HEp-2 колониями, выращенных на бульоне Luria, с дальнейшей инкубацией в течение 3 ч, с последующей микроскопией для обнаружения аггрегативно-адгерентного участка (aggregative adherence pattern). Палочки располагаются в линию одним слоем на поверхности клеток. Метод не позволяет отличить патогенные штаммы от непатогенных
- ПЦР генов, кодирующих факторы вирулентности.

Diffusely adherent *E. coli* (DAEC)

- Вызывает инфекцию мочевой системы, но описаны случаи диареи у детей < 12 мес.
- DAEC включает гетерогенную группу микроорганизмов с различными факторами вирулентности, которые включают факторы адгезии к Hep-2 клеткам. DAEC разделяют на два класса: имеющие афимбриальный адгезин (Afa)/Дрори антиген (Dr) и экпрессирующие адгезины вовлеченные в диффузную адгезию и обуславливающие диарею у детей
- 75 % штаммов имеет F1845 фимбриальный адгезин



DAF (decay-accelerating factor)

Эпидемиология DAEC

- Источник инфекции: больной человек и бессимптомный бактерионоситель.
- Механизм передачи: фекально-оральный.
- Пути передачи: алиментарный, водный.

- **Патогенез** плохо изучен, связан с факторами адгезии.
- **Клиническая картина.** Водянистая диарея, которая может стать персистирующей от 18 месяцев до 5 лет. Взрослые являются бессимптомными носителями.
- **Идентификация.** Молекулярно-генетические методы для определения генетических последовательностей, отвечающие за экспрессию адгезинов.

- **Лечение DAEC.** Оральная регидратация. Все DAEC чувствительны к цетазидиму, гентамицину, офлоксацину, налидиксовой кислоте.
- **Специфическая профилактика DAEC** не разработана

Adherent invasive *E.coli* = AIEC

- Адгерентно-инвазивная E.coli один из инфекционных агентов, участвующих в развитии болезни Крона
- AIEC это не единственный возможный этиологический агент болезни Крона. В настоящий момент считается, что болезнь Крона являются многофакторным заболеванием. Её возникновение обусловлено генетической предрасположенностью человека, составом кишечной микробиоты, факторами окружающей среды и патогенными представителями кишечной флоры.
- AIEC не экспрессирует факторы патогенности, которые можно обнаружить у других патотипов E.coli и генетическая основа их провоспалительного и инвазивного фенотипа не понятна.
- AIEC высоко вариабельны по O:H серотипам, но чаще всего встречаются O6 и O22 серотип.

AIEC

- **Эпидемиология.** У 30 % пациентов с болезнью Крона обнаруживается AIEC.
- **Патогенез** плохо изучен.
- **Клиническая картина.** Боль, лихорадка, диарея.
- **Идентификация.** Основана на способность повреждать эпителий, выживать и размножаться в макрофагах.
- **Лечение.** Разрабатываются лекарственные препараты, блокирующие адгезию.
- **Специфическая профилактика.** В настоящий момент вакцин для клинического применения не существует.

Патотип		Локализация патологического процесса	Клинические проявления	Резервуар/факторы передач	Лечение
EPEC	Дети < 5 лет, взрослые	Тощий кишечник	Профузная водянистая диарея	Человек, животные	Оральная регидратация, антибиотики при персистирующей диарее
VTEC	Взрослые, дети	Дистальный отдел тонкого кишечника, толстый кишечник	Водянистая диарея, геморагический колит, гемолитико-уремический синдром (HUS)	человек, животные; пища, вода	Регидратация, симптоматическое лечение HUS
EIEC	Дети < 5 лет, взрослые, путешественники, иммунокомпрометированные люди	Толстый кишечник		Человек, животные; вода, пища	Оральная регидратация, антибиотики
EAEC	взрослые	Тонкий кишечник и/или толстый кишечник	Диарея путешествеников, HUS	Взрослые носители; пища	Антибиотики, оральная регидратация
ETEC	Иммунокмпрометированные люди, дети < 5лет, путешественники	Тонкий кишечник	Персистирующая диарея, водянистая диарея	Человек, животные; вода, пища	Фторхинолоны, регидратация, антибиотики
DAEC	Дети (18 мес- 5 лет), взрослые	Тонкий кишечник	Персистирующая водянистая диарея у детей, обсуждается роль в развитии болезни Крона у взрослых	неизвестно	регидратация
AEIC	Взрослые, дети	Тонкий кишечник	Болезнь Крона	неизвестно	Антибиотики, хирургическое лечение