

Микробиология и лабораторный диагноз возбудителей острых кишечных инфекций



Этиологическая структура возбудителей ОКИ

- Патогенные и условно-патогенные представители семейства кишечных бактерий;
- Вибрионы;
- Кампилобактерии;
- Кишечные вирусы (ВГА, ВГЕ, рота-, энтеровирусы, вирусы полимиелита);
- Патогенные простейшие (амебы, лямблии).

Семейство Enterobacteriaceae

включает 30 родов согласно
Определителю бактерий Берджи

Клинически значимые для человека:

- **Патогенные виды:** шигеллы, сальмонеллы, ЭПКП, иерсени
- **Условно-патогенные:** протей, провиденции, клебсиеллы, гафнии и др.

Характеристика семейства

Грам «-» подвижные и неподвижные палочки, некоторые синтезируют капсулу, не образуют спор. Хорошо растут на обычных питательных средах при $T^{\circ} 37^{\circ}\text{C}$, обладают высокой ферментативной активностью по отношению к углеводам, спиртам, аминокислотам.

Ключевые биохимические тесты:



Способность ферментировать глюкозу;

Восстанавливать нитраты в нитриты;

Утилизировать углеводы по ферментативному типу;

Отсутствие фермента оксидазы.

Род шигелл

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

Различают **4 вида шигелл**:

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

Морфология и культуральные свойства

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

Морфология шигелл и сальмонелл в мазках по Граму

Возбудители сальмонеллезов

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

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



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

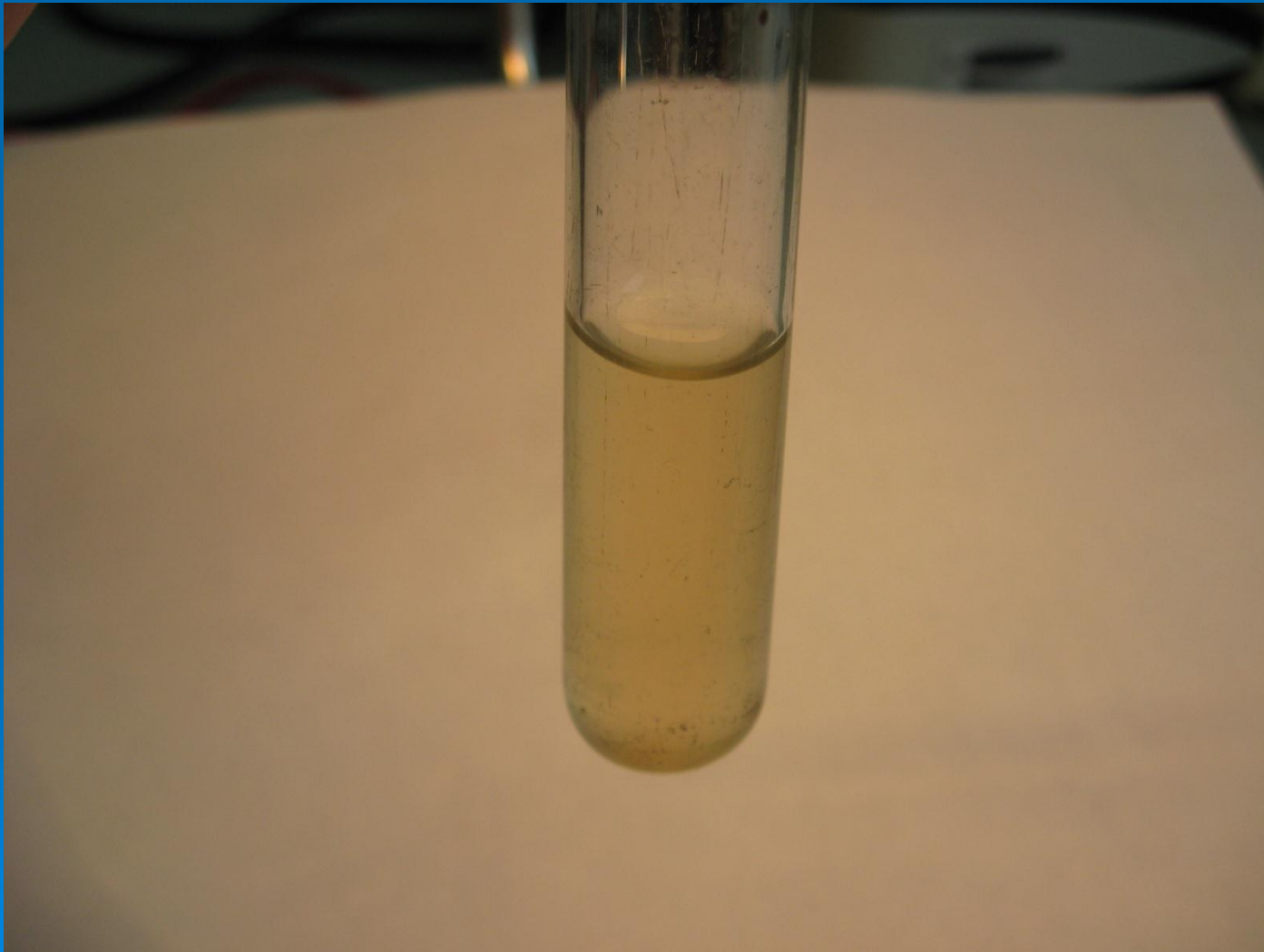


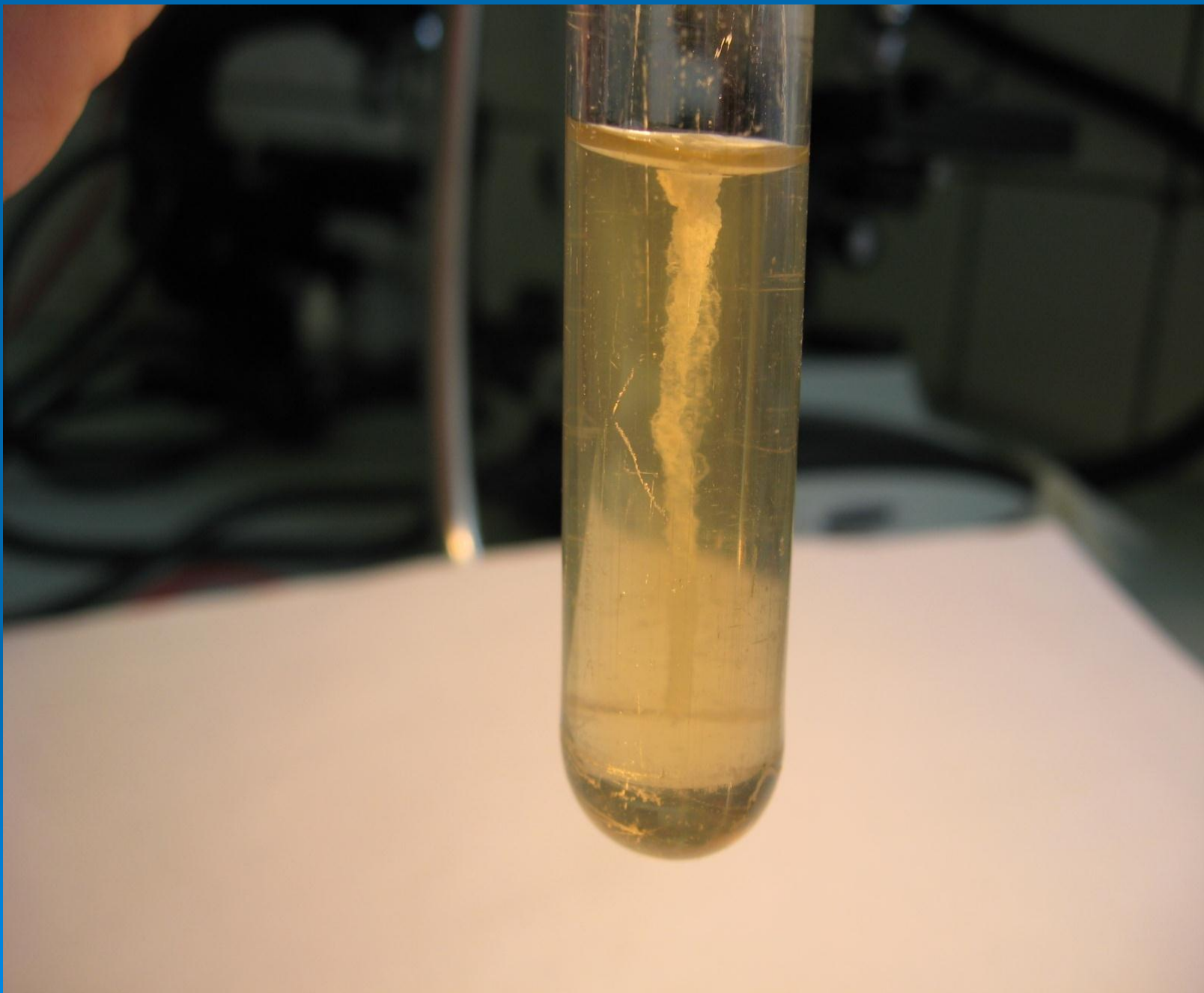
Рис. 3.51. Мазок из чистой культуры *S. flexneri*. Окраска по Граму

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

- В бульоне гладкие S-формы дают равномерное помутнение, шероховатые образуют придонный осадок, иногда пленку на поверхности среды.
- На агаре в S-форме образуют небольшие до 1 – 1,5 мм в диаметре круглые, слегка выпуклые колонии с ровными краями, бесцветные блестящие полупрозрачные мягкой консистенции. Культуры могут быть одновременно в S-, R- и переходной формах.

Рост шигелл Флекснера в бульоне





Ш. Зонне на агаре образуют два типа колоний:

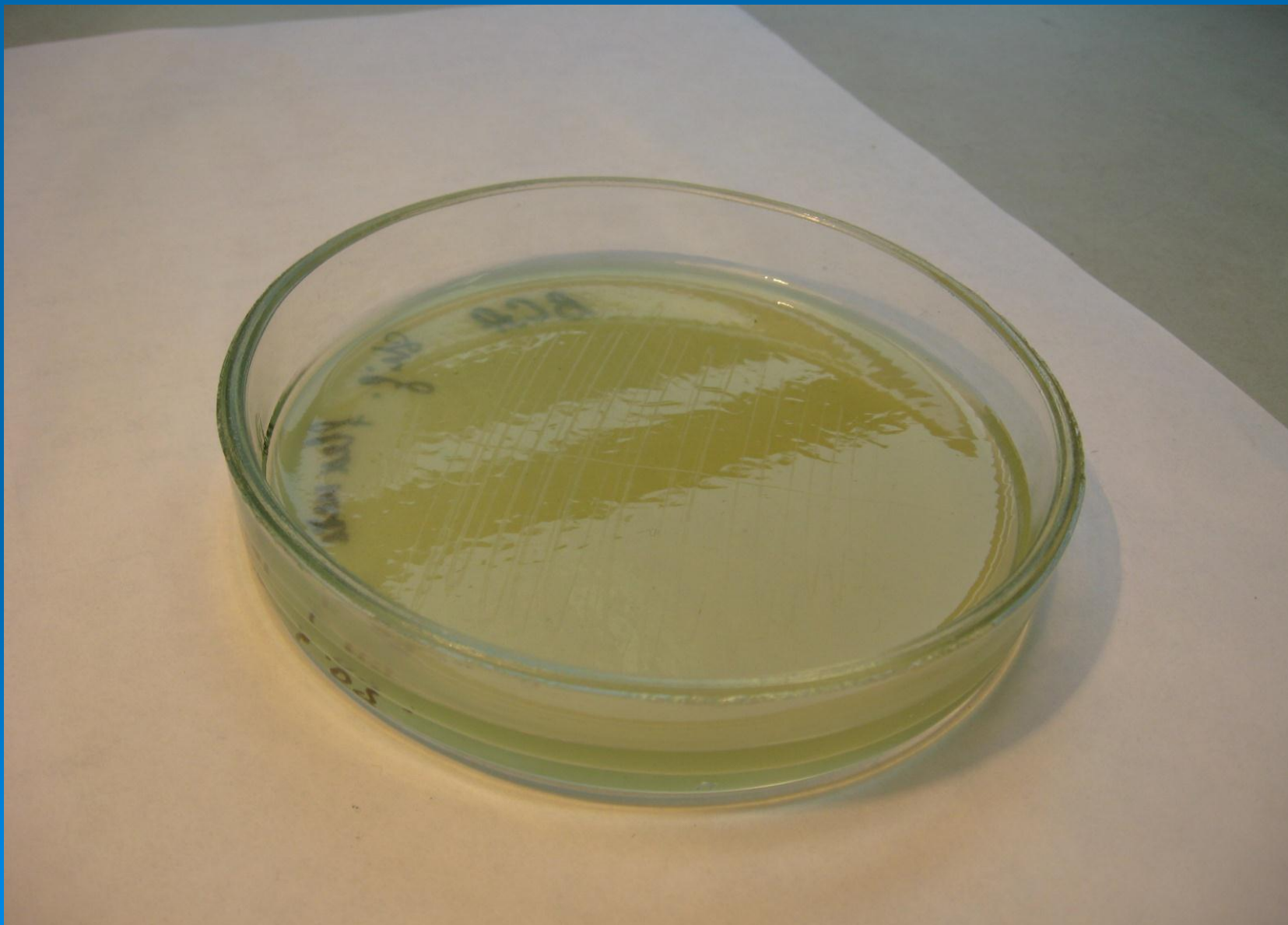
- **небольшие выпуклые колонии правильной округлой формы – 1-я фаза;**
- **крупные плоские колонии с неровными краями, напоминающие виноградный лист – 2-я фаза.**
- **Возможны промежуточные формы.**

Ш. Флекснера и Ш. Дизентерии образуют более мелкие и нежные колонии.

Колонии шигелл Флекснера на среде Плоскирева



Шигеллы не растут на ВСА

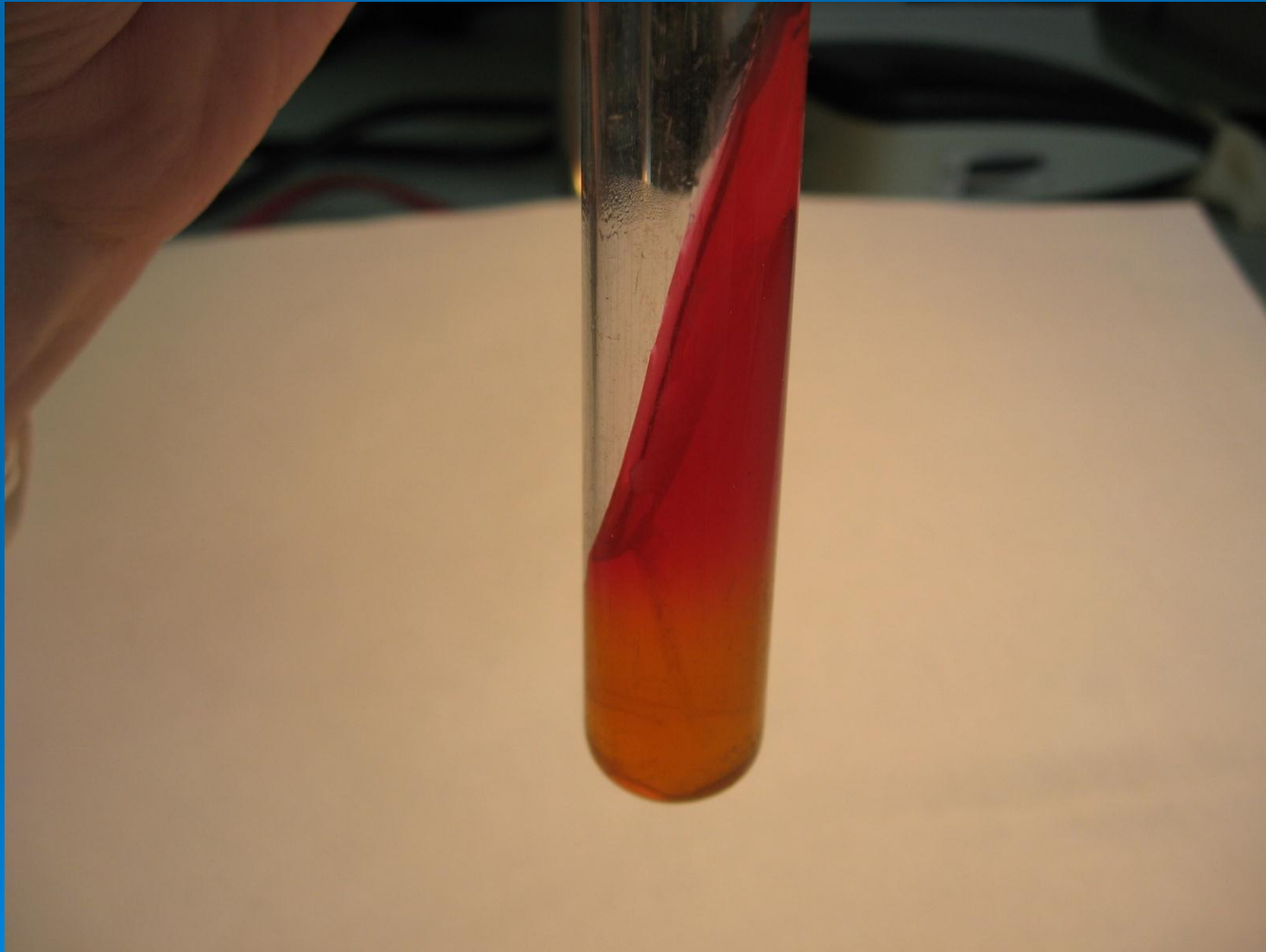


Биохимические свойства

Ш. биохимически мало активны.

- Разлагают глюкозу до кислоты без газа, маннит (кроме Ш. Дизентерии), дают положительную реакцию с метиловым красным; индол образуютvariably.
- Не продуцируют сероводород на среде Клиглера, не ферментируют лактозу (кроме Ш. Зонне), сахарозу, желатин, адонит и инозит, не гидролизуют мочевины, малонат натрия, цитрат в среде Симмонса, не ферментируют фенилаланин и лизин.

Рост шигелл на среде Клиглера



Антигенное строение

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

Схема серологической идентификации шигелл

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

- В случае отрицательного результата с поливалентной сывороткой к Ш. Флекснера ставится РА с сывороткой к Ш. Зонне к I и II-й фазам.
- 2. Маннит «+» штаммы Ш. испытывают с поливалентной антисывороткой к Ш. Бойда; при «+» РА проводится расшифровка с моносыворотками (1-18).
- 3. Маннит «-» штаммы Ш. агглютинируют с поливалентной сывороткой к Ш. Дизентерии, при наличии агглютинации реакцию развертывают с моновалентными сыворотками (1 – 12).

Серологические методы диагностики:

➤ РНГА

➤ Экспресс-методы - выявление Аг шигелл
в испражнениях:

РКА, РЛА, РНГА, ИФА

Факторы патогенности

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

Терапия

Препараты выбора – ампициллин, котримоксазол, цефалоспорины и др. с учетом АБ-чувствительности.

Эубиотики: бифидумбактерин, бификол, колибактерин, лактобактерин. Полезно определение формы и степени дисбактериоза по соотношению микробов естественной флоры кишечника.

- Назначаются симптоматические средства и восполнение потерь жидкости и электролитов.

Род сальмонелл

- Впервые выделены Д. Сэльмоном и Смитом в 1885 г.
- Род сальмонелл организован Линьером в 1900 г.
- Сейчас в род Сальмонелл входят два вида: ***S. bongori*** и ***S. holeraesuis***, объединяющий
- **5 подвидов.**
- Подвиды ***holeraesuis*** и ***salamae*** включают наибольшее число патогенных для человека и животных сальмонелл.
- Известно более **2300** сероваров сальмонелл.

Морфологические и культуральные свойства

Мелкие Грам «-» палочки с закругленными концами. Подвижны за исключением некоторых сероваров. Не образуют спор и капсул. Диапазон роста при T° 8 - 45°, T° оптим. 37° C, pH 4,1 – 9,0; pH оптим. 7,2 – 7,4. Факультативные анаэробы.

Хорошо растут на обычных питательных средах. На агаре S-формы вырастают в виде небольших колоний d до 2 – 4 мм прозрачных, нежных, слегка выпуклых с ровным краем. В R-форме колонии более плоские, шероховатые с изрезанными краями.

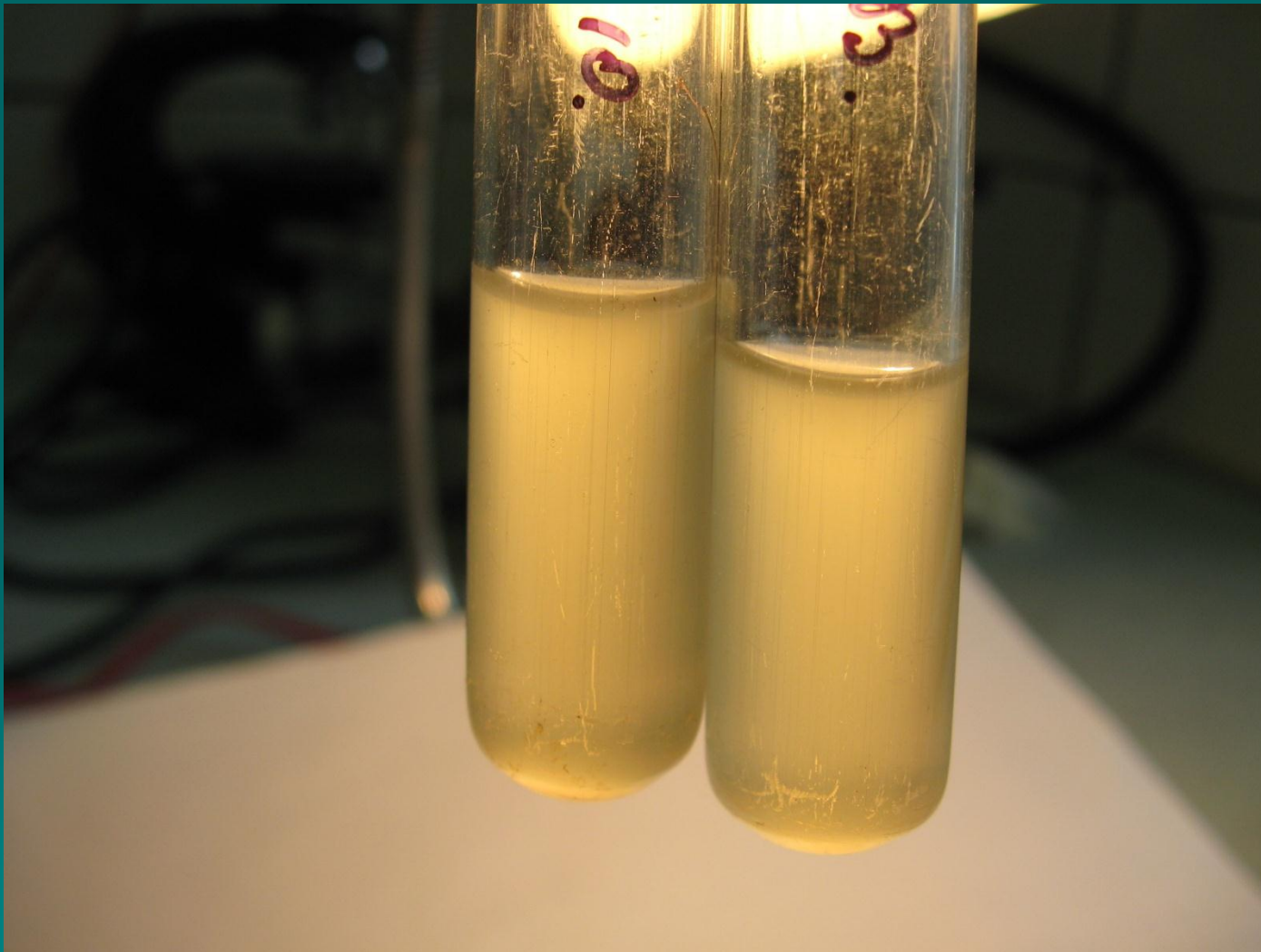
S. enteritidis **S. paratyphi B** через 2 – 3 суток инкубации при комнатной T° образуют по периферии колоний **слизистый вал**.

На среде **Эндо** колонии *S.* розоватые, прозрачные, на среде **Плоскирева** – бесцветные, более плотные и мутноватые.

На **ВСА** – черные с металлическим блеском (у *S.*, образующих сероводород).

В **бульоне** гладкие формы *S.* дают равномерное помутнение, шероховатые – осадок на дне пробирки.

Рост возбудителей брюшного тифа (справа) и паратифа В в бульоне



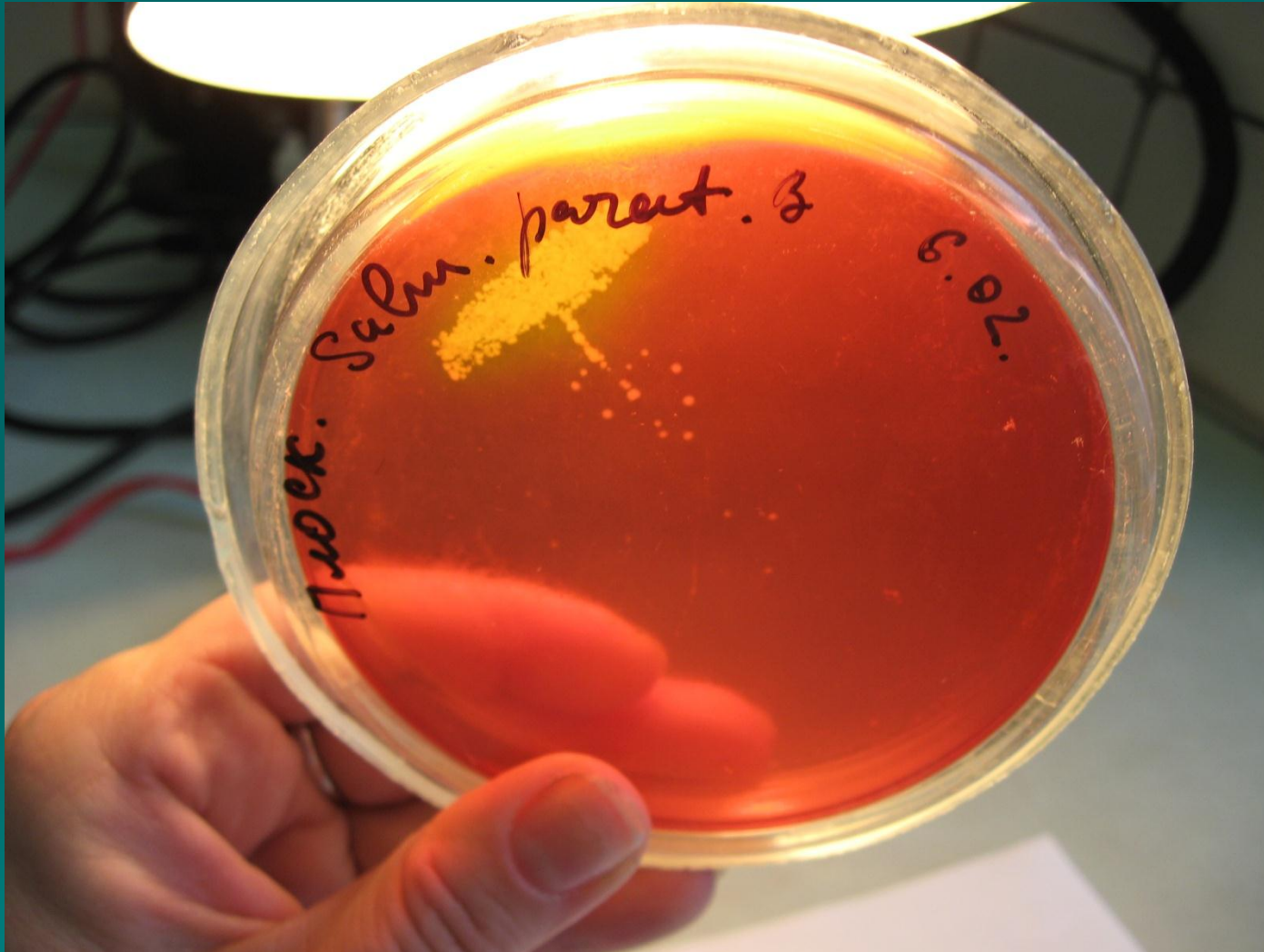
Колонии возбудителя брюшного тифа на среде Эндо



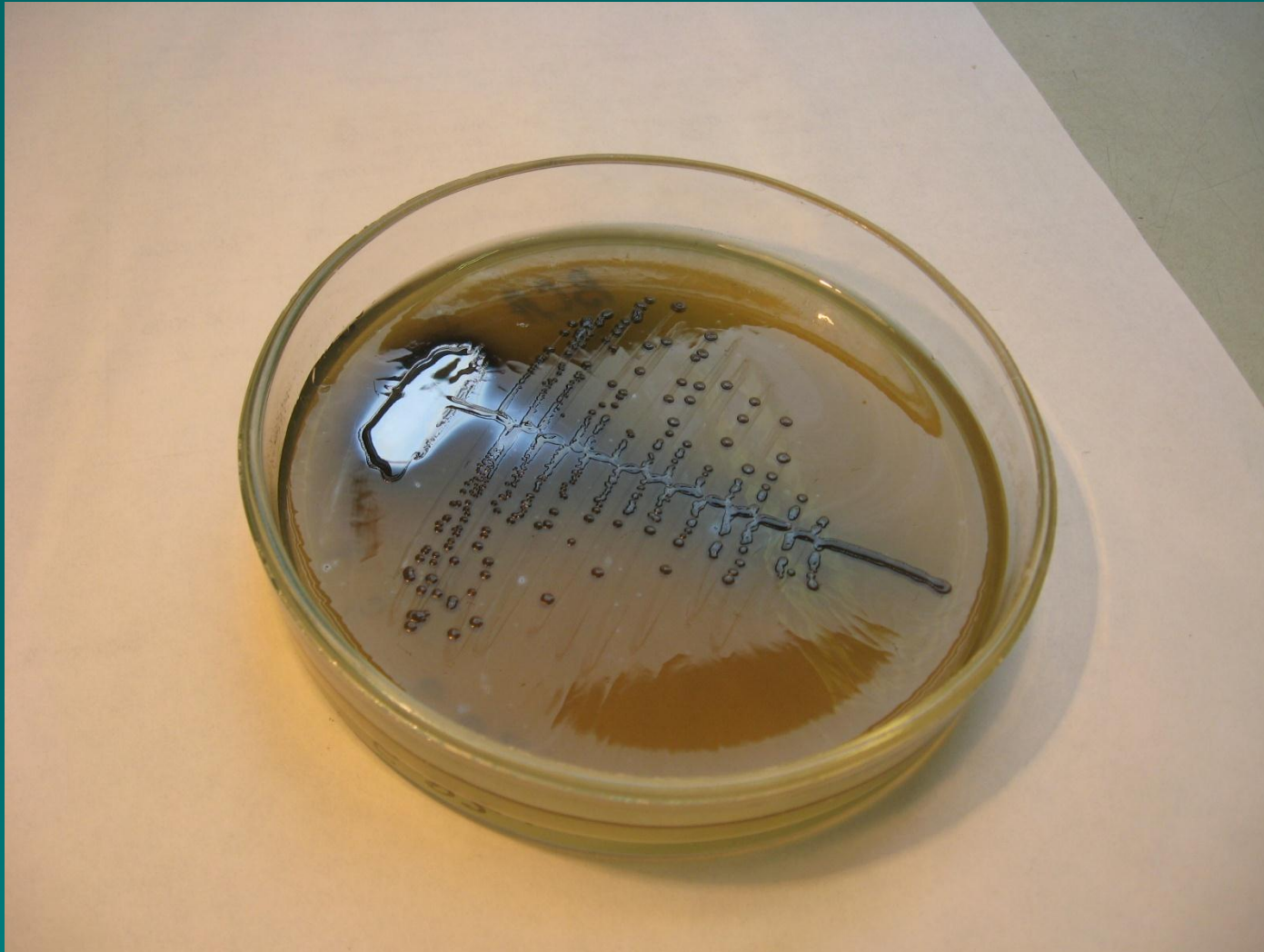
Колонии сальмонеллы паратифа В на среде Эндо



Колонии возбудителя паратифа В на среде Плоскирева



Рост *S. paratyphi* В, продуцирующих сероводород, на ВСА



Биохимические свойства

Разнообразны и различаются в пределах одного серовара.

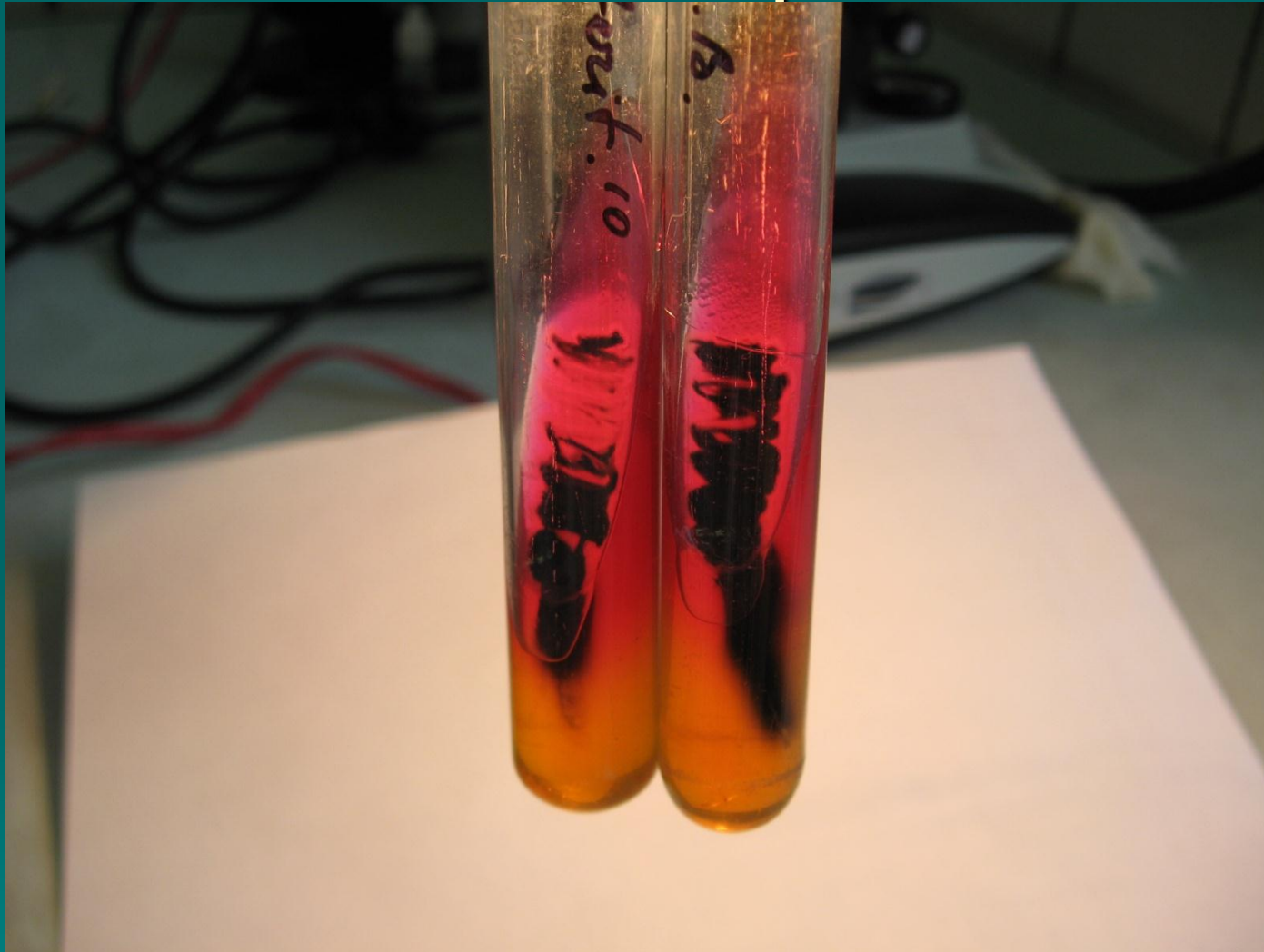
Разлагают глюкозу до кислоты и газа (кроме *S. typhi*), не ферментируют лактозу, сахарозу, салицин и адонит, не расщепляют мочевины.

Особенности *S.*: образование сероводорода, отсутствие продукции индола, утилизация цитрата в среде Симмонса (кроме *S. typhi*).

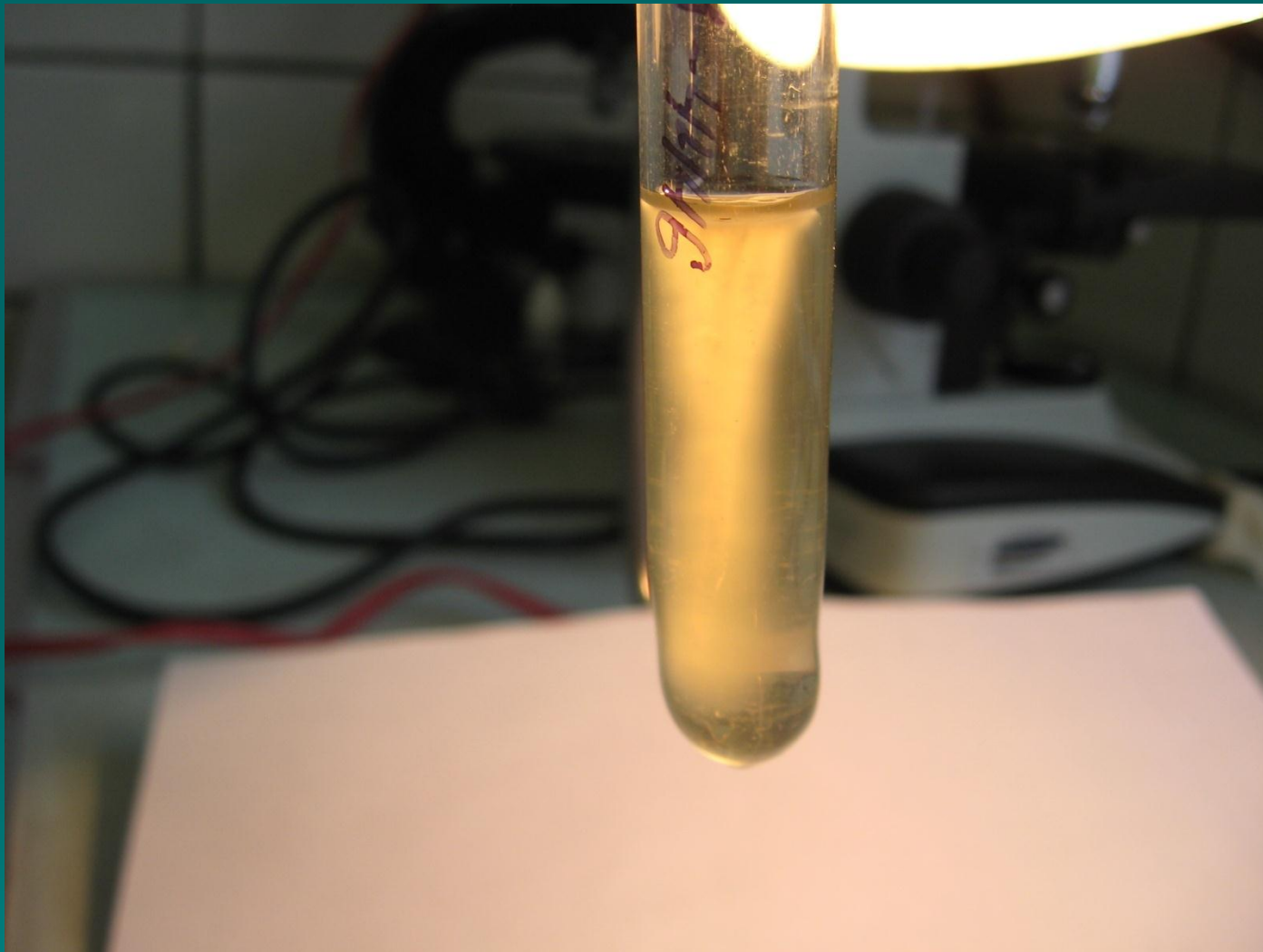
Имеют ферменты лизин- и орнитиндекарбоксилазу и аргининдигидролазу.

Дают положительную реакцию с метиловым красным, образуют ацетоин в реакции Фогес-Проскауэра.

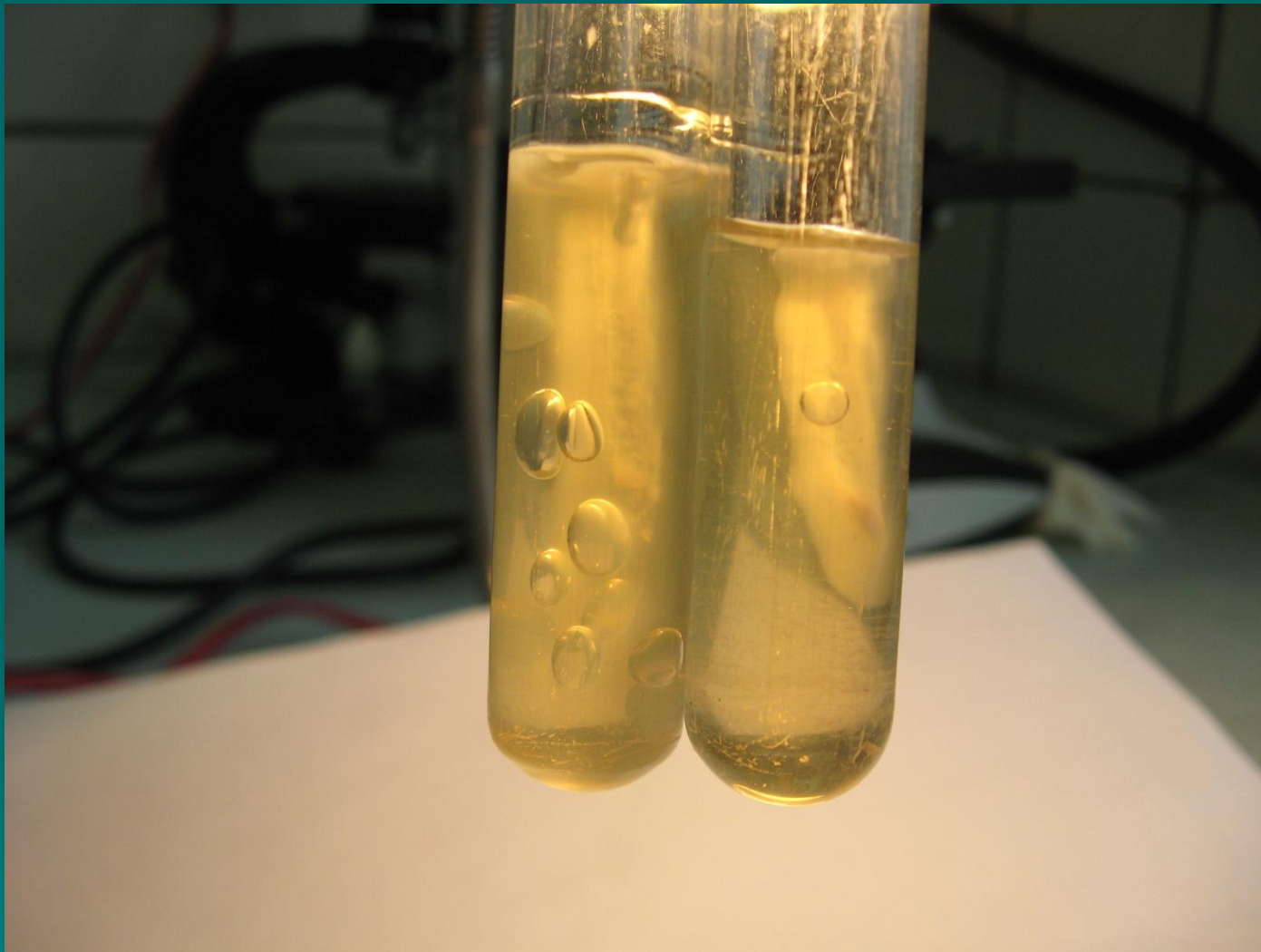
Рост возбудителей брюшного тифа (справа) и паратифа В на среде Клиглера



Тест на подвижность сальмонелл (посев *S. typhi* в 0,3% ПЖА)



Образование пузырьков газа *S. paratyphi* B в 0,3% ПЖА



Рост сальмонелл на среде Симмонса



Антигенная структура

- О-Аг – соматический, термостабилен. По нему проводится разделение сальмонелл на серогруппы.
- Н-Аг – жгутиковый, белковый, термолабилен. Может существовать в 2-х фазах – специфической и неспецифической (или 1-й и 2-й).
- Vi-Аг – Аг вирулентности, поверхностный. Термолабилен, разрушается при кипячении через 10 минут.
- К-Аг – поверхностный. Стимулирует синтез АТ.
- М-Аг – слизистый, присутствует у слизистых штаммов.

- Серологическую идентификацию С. проводят с учетом трех основных Аг: О-, Н- и Vi-Аг.

Принцип положен в основу диагностической антигенной схемы Кауфмана-Уайта.

На основе наборов О-Аг все С. разделены на 67 серогрупп: А, В, С, и т. д.; с учетом Н-Аг – на серовары.

В 1992 г. было известно 2324 серовара.

- Серологическая идентификация С. начинается с постановки ОРА на стекле с поливалентной сальмонеллезной сывороткой **АВСДЕ**, включающей АТ ко многим известным С.; далее ОРА разворачивается с **О-** и **Н-** монорецепторными сыворотками.
- Серологическая диагностика: РНГА в парных сыворотках с эритроцитарными О-диагностикумами, Vi-брюшнотифозным диагностикумом .

Периоды исследования соответствующего материала от больного для выделения *S.* при тифо-паратифозных заболеваниях:

- **Из крови** – на 1 – 2 неделе в период бактериемии;
- **Из испражнений** – со 2 – 3-й недели болезни и у б/носителей;
- **Из мочи** – с конца 2-й недели и у некоторых б/носителей;
- **Из желчи** – в течение всей болезни и у б/носителей;
- **Из розеол** – при их наличии.

- А также из гноя, экссудатов, спинномозгового ликвора при имеющихся осложнениях и специальных показаниях.
- От умерших – из желчного пузыря, селезенки и кишечника.
- При пищевых токсикоинфекциях окончательный диагноз устанавливается только при выделении возбудителя из организма больного и из продуктов питания.

Терапия

- При брюшном тифе и паратифах антибиотики назначаются до 10 дня нормальной T° тела: хлорамфеникол, бактрим, левомицетин, ампициллин, иногда в сочетании с гентамицином, азитромицин, цефалоспорины 3-го поколения (цефтриаксон) и фторхинолоны (ципрофлоксацин).
- Больным с гастроинтестинальной формой сальмонеллеза – патогенетическая терапия, направленная на дезинтоксикацию, восстановление водно-электролитного баланса и гемодинамики.

Род эшерихий

- Представлен одним видом и многочисленными биоварами и сероварами, различными по биохимическим, антигенным и патогенным свойствам.
- Открыты Теодором Эшерихом. Он выделил из кишечника детей и назвал **Bacterium coli communis**.
- В 1937 г. род был включен в семейство кишечных бактерий **Enterobacteriaceae**.
- В 1958 г. был признан типовым родом семейства.

Морфологические и культуральные свойства

Эшерихии (Э.) – мелкие и крупные, длиной 2 – 6 мкм Грам «-» палочки. В мазках располагаются одиночно или попарно. Подвижны или неподвижны. Большинство штаммов имеют капсулу. Аэробы или факультативные анаэробы. Оптим. T° 37°C, pH 6,5 – 7,4. Хорошо растут на простых средах, образуя на агаре колонии средней величины, влажные, блестящие, прозрачные и непрозрачные, в S-форме – круглые с ровным краем, в R-форме – более плоские, сухие.

Чистая культура *E. coli* в мазке по Граму



Рис. 3.40. Чистая культура *E. coli*. Окраска по Граму

В бульоне растут диффузно или образуют осадок, иногда пленку на поверхности и пристеночное кольцо.

На среде Эндо лактозо «+» непатогенные штаммы Э. образуют колонии темно-малинового цвета с металлическим блеском или без него, на среде Левина (ЭМС) – колонии темно-синего цвета; штаммы, неферментирующие лактозу, дают бесцветные колонии.

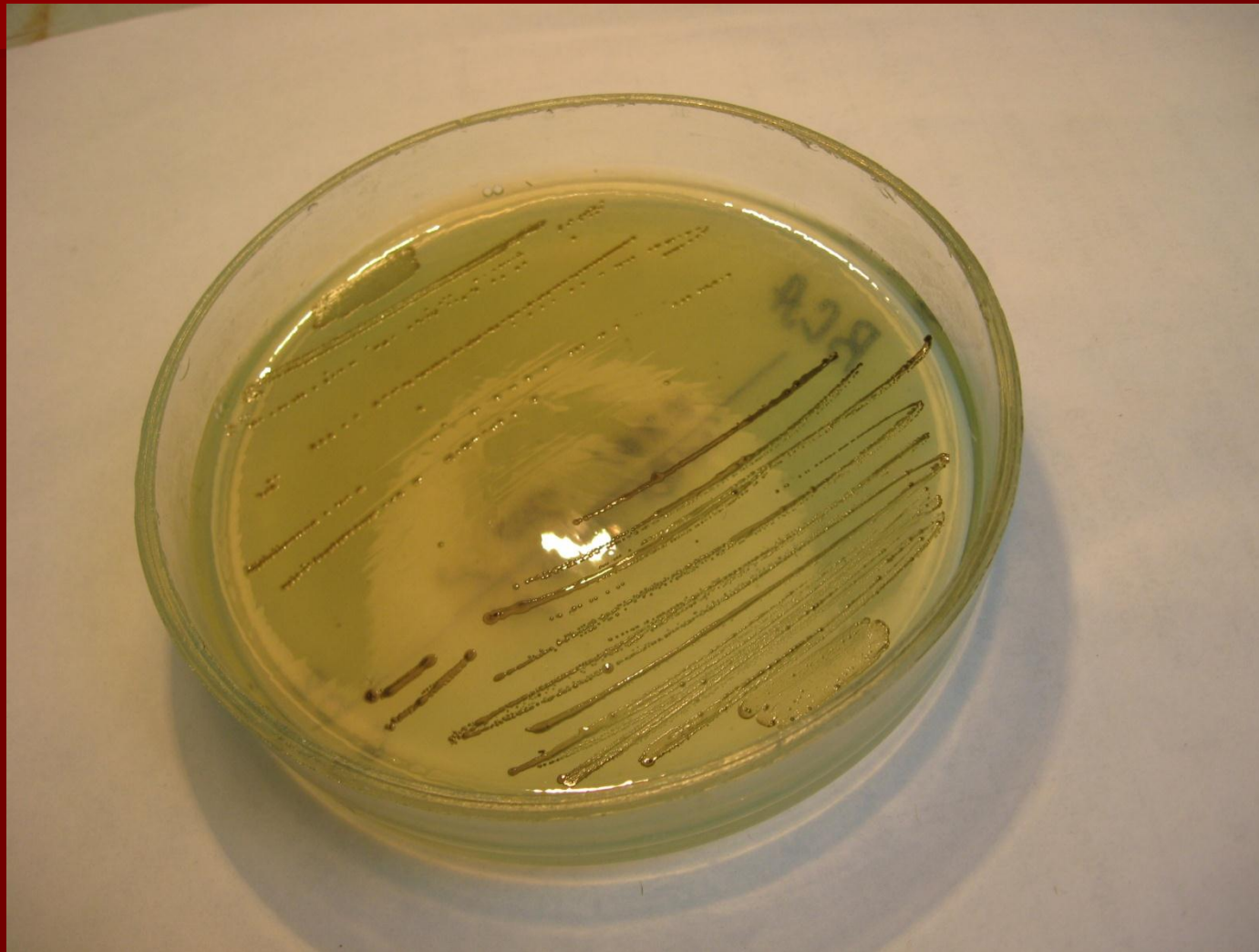
Рост кишечной палочки на среде Эндо



Рост кишечной палочки на среде Плоскирева



Рост кишечной палочки на ВСА



УСТОЙЧИВОСТЬ

- Месяцами сохраняются в почве, воде, испражнениях. Хорошо переносят высушивание, способны размножаться в пищевых продуктах, особенно в молоке. Быстро гибнут при кипячении и дезинфекции.

Биохимические свойства

Э. обладают высокой биохимической активностью.

Ферментируют углеводы и спирты до кислоты или кислоты и газа: постоянно – глюкозу, маннит, непатогенные штаммы разлагают лактозу, не ферментируют адонит и инозит. Другие углеводы и спирты сбраживают вариабельно. Образуют индол, но не сероводород, каталазоположительны, оксидазоотрицательны. Не имеют уреазы, липазы, желатиназы, дают положительную реакцию с метиловым красным, постоянно разлагают лизин, не расщепляют фенил-аланин.

Рост кишечной палочки на среде Клиглера и в 0,3% ПЖА



Антигенная структура

Дифференциация Э. основана на различии в структуре поверхностных Аг-в:

О-Аг, Н-жгутиковых и К-капсульных.

Типирование по О-Аг – ведущее.

Э. делятся на серогруппы по сочетанию О- или ОК-Аг, далее - на серовары по сочетанию ОКН- или ОН-Аг.

О:К:Н (O25:K7:H42 или O24:K72)

Известно около 170 антигенных вариантов *E. coli*, более 80 из них вызывают коли-инфекцию.

Серологическая идентификация эшерихий начинается с ОРА на стекле с поливалентной сывороткой **ОКА**, далее - с **ОКВ, ОКС, ОКД**. Затем идет расшифровка с помощью **О-** и **ОК-** сывороток.

ОКА

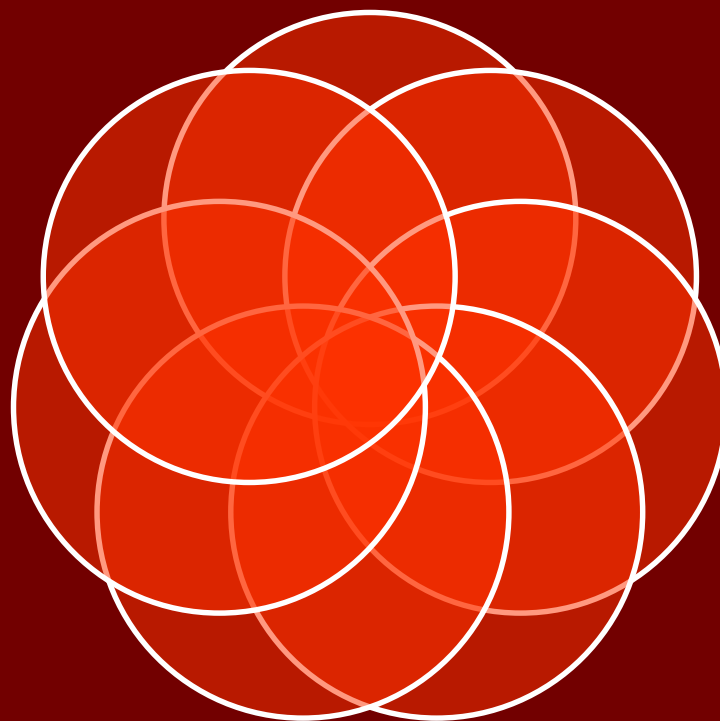
ОКВ

ОКС

ОКД

ОК-

О-



Факторы патогенности:



Капсула;

Пили адгезии или фимбриальные факторы, обеспечивающие прикрепление к эпителию и колонизацию нижних отделов тонкой кишки;

Энтеротоксины;

Гемолизины.

Заболевания:

- Кишечные инфекции;
- Перентеральные формы эшерихиозов: сепсис, менингит, энцефалит, пневмонии, поражения мочевыводящих путей, перитонит, офтальмит;
- Гнойные осложнения ран и ожогов;
- Внутрибольничные инфекции, часто в ассоциациях с другими микробами (стафилококком, протеем, синегнойной палочкой).

Типы эшерихий:

- **Энтеротоксигенные** – способны к колонизации кишечника и токсинообразованию;
- **Энтероинвазивные** – схожие с шигеллами по способности к инвазии и размножению внутри клеток кишечника;
- **Энтеропатогенные** – проявляют адгезию и вырабатывают продукты, изменяющие строение слизистой оболочки кишки; чаще поражают детей 1-го года жизни;
- **Энтероадгезивные** – быстро прикрепляются к кишечному эпителию.

- **Энтерогеморрагические** – вызывают геморрагический колит и гемолитико-уремический синдром. Продуцируют цитотоксины, шигаподобный токсин.
(O157:H7; O26:H11)

ЛЕЧЕНИЕ:

фуразолидон, ампициллин, бактрим, норфлоксацин; при тяжелом течении и инфекции мочевыводящих путей – фторхинолоны (ципрофлоксацин, пефлоксацин), цефалоспорины и аминогликозиды. Определение антибиотикограммы.

✕ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ:

- ✗ Испражнения;
- ✗ Рвотные массы;
- ✗ Промывные воды желудка;
- ✗ Желчь;
- ✗ Кровь;
- ✗ Моча;
- ✗ Содержимое розеол;
- ✗ Гной;
- ✗ Спиналмозговой ликвор;
- ✗ Секционный материал.

СРЕДЫ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ КИШЕЧНЫХ БАКТЕРИЙ

✗ СРЕДЫ ОБОГАЩЕНИЯ:

- ✗ Желчный бульон - б-н с добавлением 10 – 20% желчи;
- ✗ Среда Рапопорт – б-н, 10% желчи, 2% глюкозы и 1% индикатора (Андреде или БТС);
- ✗ Селенитовый бульон;
- ✗ Среды магниевая, Мюллера, Кауфмана, Килмиана – для посева материала, контаминированного посторонней микрофлорой.

ЭЛЕКТИВНЫЕ И СЕЛЕКТИВНЫЕ СРЕДЫ:

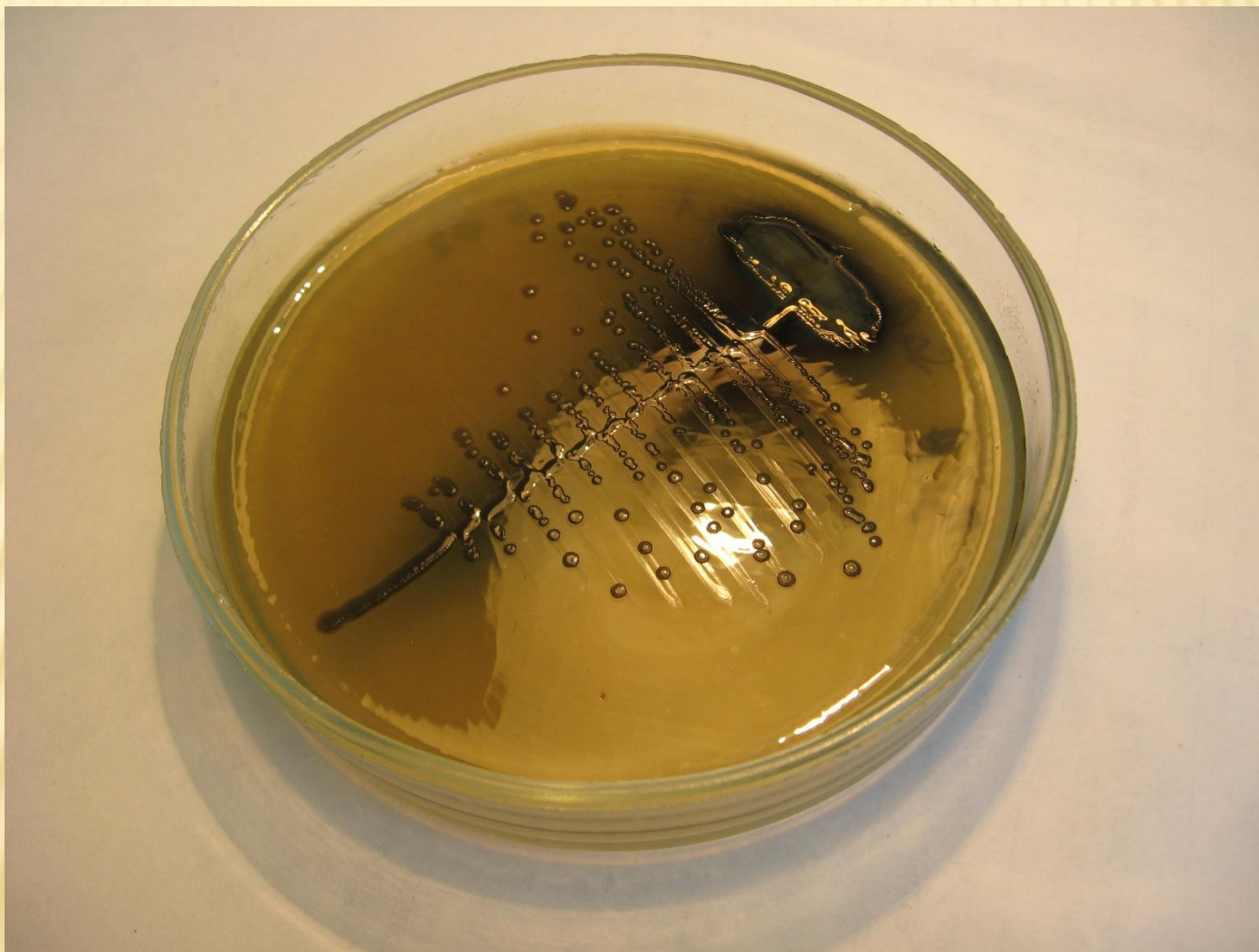
- ✗ Среда **Эндо** – лактоза, индикатор фуксин, стабилизатор окраски – сульфит натрия;
- ✗ Среда **Левина (ЭМС)** – лактоза, эозин, метиленовый синий;
- ✗ Среда **Плоскирева** – лактоза, соли желчи, бриллиантовый зеленый, йод, индикатор нейтральный красный;
- ✗ **Висмут-сульфит агар** – бриллиантовый зеленый и основной висмут, сульфит железа.

7400

СРЕДА ПЛОСКИРЕВА



СРЕДА ВСА



СРЕДЫ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ

- ✗ **Среды Гисса;**
- ✗ **Рессель I** – 0,4% агар, 0,1% глюкозы, 1% лактозы, индикатор;
- ✗ **Рессель II** – 0,1% маннита, 1% сахарозы, индикатор;
- ✗ **Среда Клиглера** – 0,1% глюкозы, 1% лактозы, соли железа для улавливания сероводорода, индикатор феноловый красный.



- ✗ **Среда Олькеницкого** – 0,1% глюкозы, 1% лактозы, 1% мочевины, соль Мора для улавливания сероводорода, индикатор феноловый красный. Выявляет ферментацию сахаров, образование сероводорода и уреазную активность.
- ✗ **Наборы СИБ № 2, ММТ** (Ставрополь, Махачкала, Чехия «Lachema»), Enterotube, API-20E.

ЭТАПЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1 ДЕНЬ

- ✗ Подготовка материала к исследованию;
- ✗ Бактериоскопия нативного материала (при анализе материала из стерильных полостей и гноя);
- ✗ Посев в среды обогащения:
- ✗ кровь, желчь, спинномозговой ликвор – в желчный бульон, среду Рапопорт;

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

-Посев на плотные элективные и селективные среды – Эндо, Левина, Плоскирева, ВСА.

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

2-Й ДЕНЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

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

- ✘ Высев из сред обогащения на плотные среды, приготовление мазка с окраской по Граму;
- ✘ Изучение подвижности методом висячей или раздавленной капли или посевом в 0,3% полужидкий агар;
- ✘ Посев в питательный бульон + индикаторные полоски на выявление индола и сероводорода;
- ✘ Посев в среду Симмонса;
- ✘ Постановка ОРА с поливалентной эшерихиозной сывороткой ОКА.

3-Й ДЕНЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

- ✗ Первичное изучение биохимической активности на ПУС, определение подвижности (учет тестов);
- ✗ Изучение АГ-го строения выделенной культуры с использованием поливалентных сывороток к шигеллам, сальмонеллам, ЭПКП;
- ✗ Подбор необходимого набора биохимических тестов для определения рода возбудителя и посев.
- ✗ Проба на чувствительность к АБ-м методом ДИСКОВ.

4-Й ДЕНЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

- ✗ Выдача заключения о выделении культуры соответствующего рода и вида.

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!

