

Микробиология и лабораторный диагноз холеры

Растунцева Елена Васильевна

- Возбудителями холеры являются токсигенные холерные вибрионы O1 серогруппы биовара классического и эльтор и O139 серогруппы, имеющие в хромосоме определенный набор генов (ctxAB и tcpA), способные к эпидемическому распространению.

- В 1854 г. Пачини впервые обнаружил холерные вибрионы во Флоренции
- В 1883 г. Роберт Кох в Египте первым выделил возбудитель холеры в чистой культуре и всесторонне изучил его свойства.
- В 1906 г. супруги Готшлих на карантинной станции Эль Тор впервые выделили холерный вибрион биовара Эльтор.

- В 1992 – 1993 гг. в Индии и Бангладеш эпидемия холеры была вызвана новой разновидностью возбудителя – холерным вибрионом O139 серогруппы (Бенгал).
- Были зарегистрированы десятки тысяч больных.

Классификация вибрионов

Семейство Vibrionaceae

Типовой род *Vibrio*

Другие роды:

Aeromonas

Plesiomonas

Photobacterium

Enhydrobacter

Типовой вид *V. cholerae*

Другие виды
вибрионов

Серогруппы *V. cholerae*:

O1

O139

non O1/O139

(O2-O138, O140-O206)межд.

(O2 – O83) отеч.

Биовары *V. cholerae* O1:

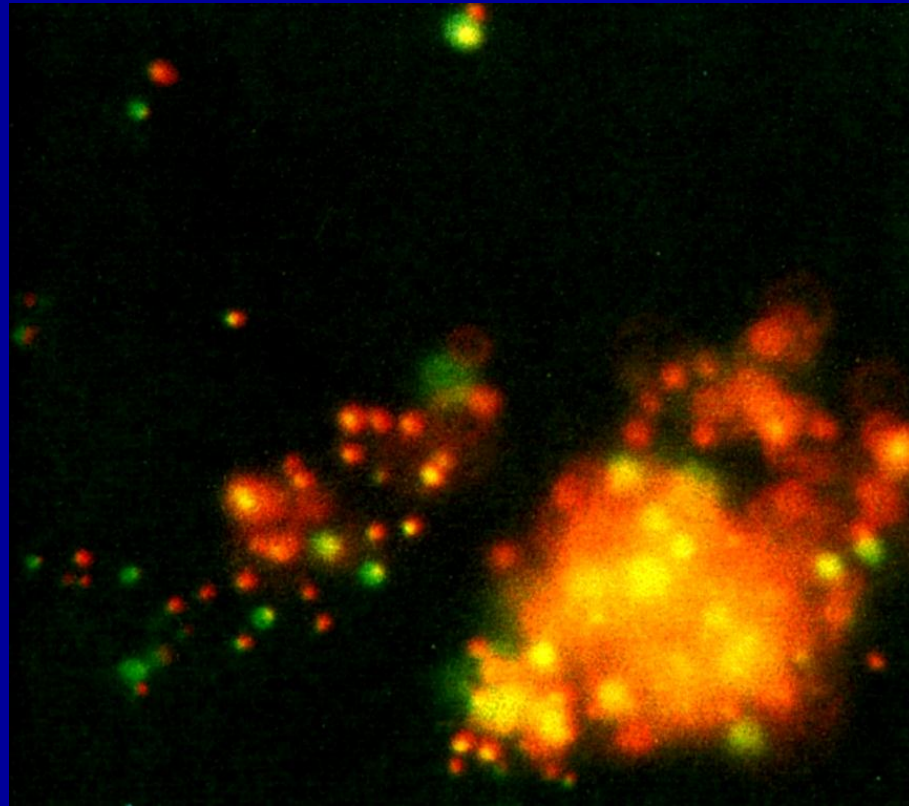
V. cholerae cholerae

V. cholerae eltor

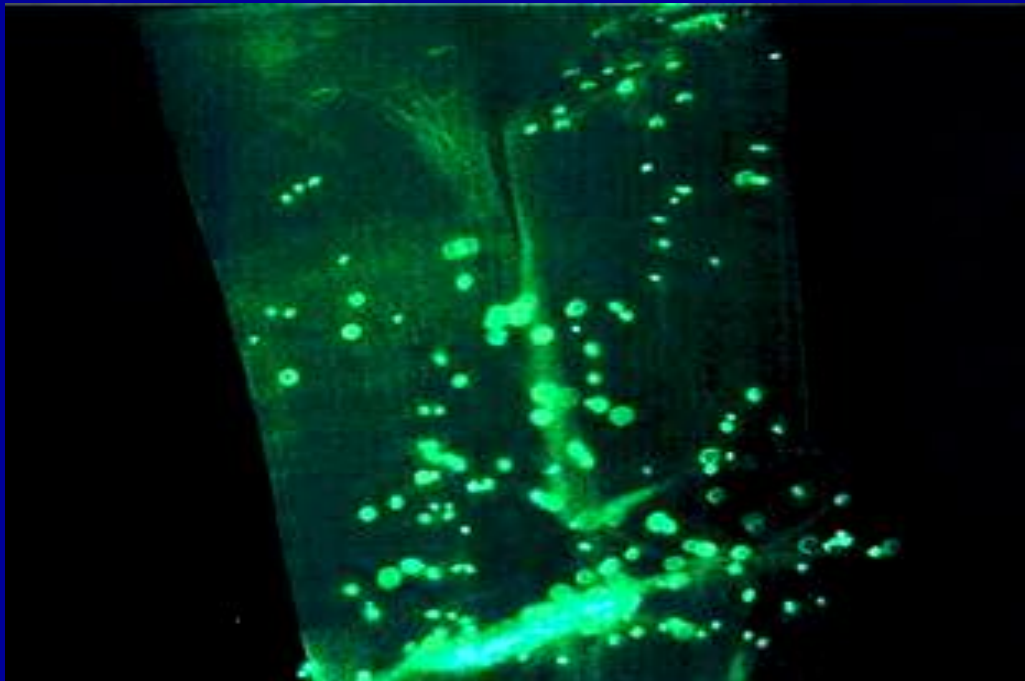
Серовары: Инаба, Огава, Гикошима

- Для улучшения адаптации возбудитель холеры образует шероховатые формы, переходит в некультивируемое состояние, формирует биопленку на твердом субстрате.

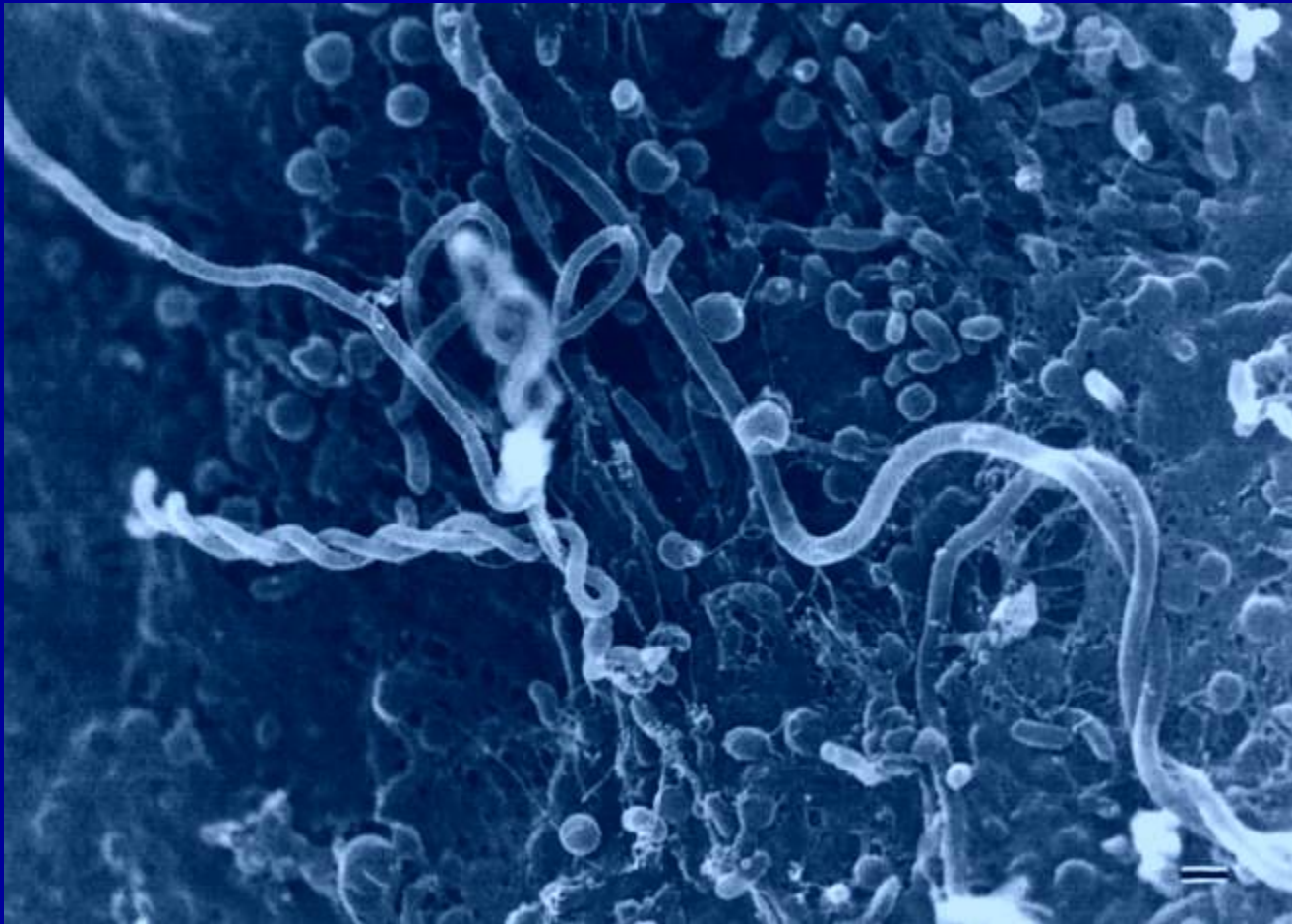
Свечение некультивируемых форм холерных вибрионов



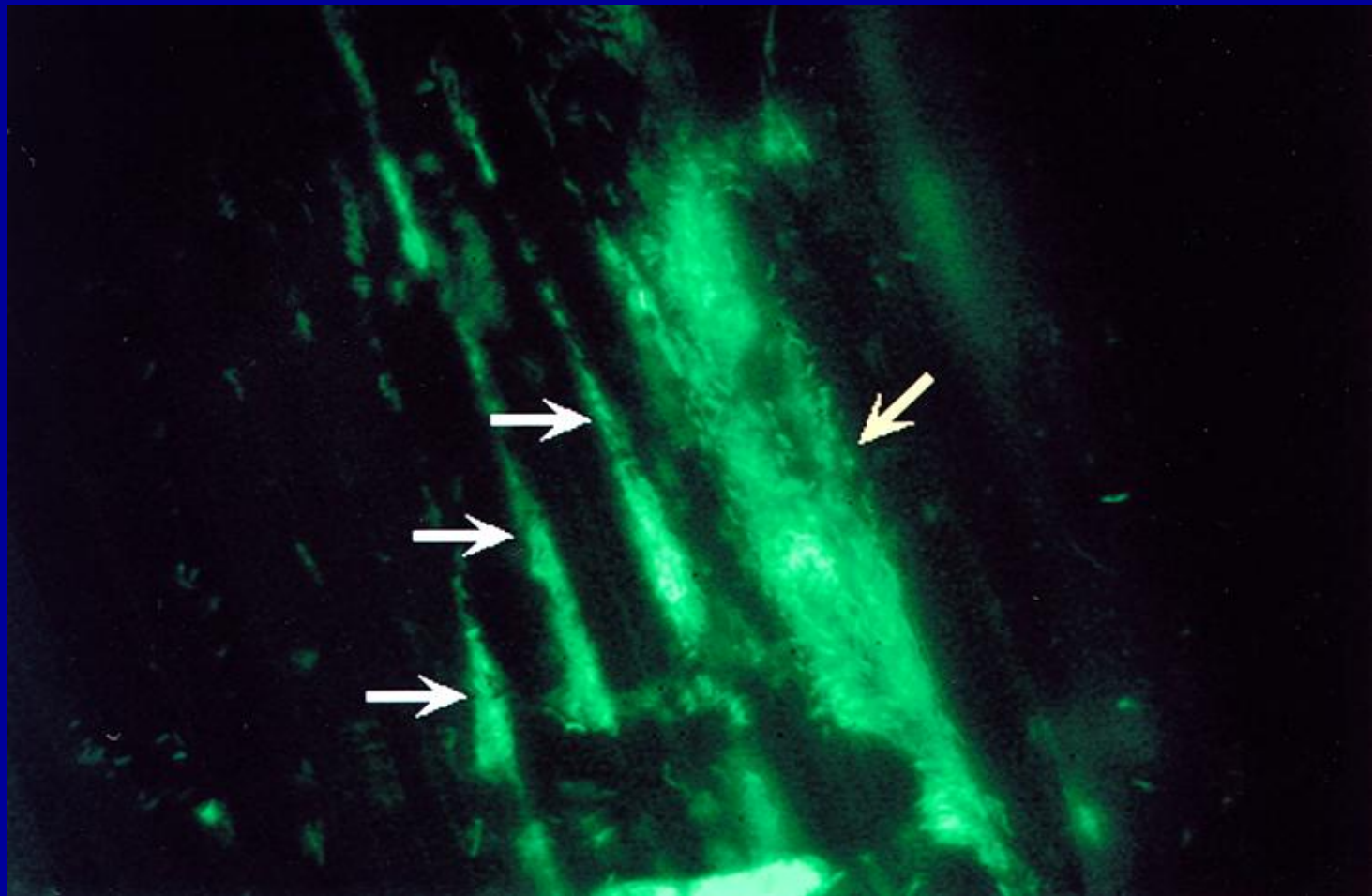
Формирование холерным вибрионом биопленки на зоопланктоне



Клетки холерного вибриона в биопленке



Формирование биопленки на растительном субстрате



Биохимические свойства холерных вибрионов.

- **ФЕРМЕНТИРУЮТ** глюкозу, маннит, маннозу, сахарозу, крахмал,
- **НЕ АКТИВНЫ** по отношению арабинозе, инозиту, салицину.
- **ОБЛАДАЮТ** декарбоксилазой лизина и орнитина,
- **НЕ ИМЕЮТ** дигидролазы аргинина.

- Образуют индол, не продуцируют сероводород на ПУС, восстанавливают нитраты в нитриты.
- Относятся к I группе Хейберга (сахароза+, манноза+, арабиноза-), реже ко II.
- продуцируют ИНДОФЕНОЛОКСИДАЗУ, МУЦИНАЗУ, ЛЕЦИТИНАЗУ, НЕЙРАМИНИДАЗУ, ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИЕ И ДРУГИЕ ФЕРМЕНТЫ.

Антигенное строение

- Соматический О-АГ, определяющий видовую и серовароспецифическую активность.

О1-АГ Включает в себя три основных АГ: А, В, С. Их сочетания образуют 3 серовара:

АВ – ОГАВА,

АС – ИНАБА,

АВС – ГИКОШИМА.

- Жгутиковый Н-АГ, белковой природы, термолабилен.

Патогенез холерной инфекции обеспечивается свойствами холерного вибриона:

- *подвижность**
- *хемотаксис**
- *способность к адгезии**
- *токсигенность.**

Стадии развития холерной инфекции:

- 1. Движение возбудителя по направлению к
слизистой оболочке кишечника.**

- 2. Проникновение через гель слизистой оболочки.
- 3. Прикрепление вибрионов к поверхности краевых щетинок эпителиоцитов с помощью пилей – белковых выростов на поверхности клеток.
- 4. Продукция холерогена и других токсических субстанций.

Детерминанты вирулентности холерного вибриона.

- АДГЕЗИНЫ – белковые выросты на поверхности клетки. Являются гемагглютинаинами.
- ОСНОВНОЙ ФАКТОР КОЛОНИЗАЦИИ - токсинкорректируемые пили адгезии – ТСР.
- ДОБАВОЧНЫЕ ФАКТОРЫ КОЛОНИЗАЦИИ– АСФ.
- Внутренние пили – СЕР.

- **ХОЛЕРОГЕН** (холерный экзотоксин) – **СТ**.

Включает:

- **СУБЪЕДИНИЦУ А** (оказывает токсическое воздействие на организм), состоит из фрагментов **A1** и **A2**.

- **СУБЪЕДИНИЦУ В**. Нетоксична, иммуногенна.

Состоит из 5-ти нуклеотидов. Прикрепляется к ганглиозиду **GM 1** эпителиоцитов тонкой кишки.

- Токсин зонального поглощения – ZOT
- Добавочный холерный токсин – ACE
- Шига-подобный токсин
- Новый холерный токсин – NST
- Эндотоксин – ЛПС, выделяется при гибели клеток.
- Цитотоксический комплекс RTX
- Цитотонический фактор Cef
- NMDCST токсин
- N07 токсин
- Cholex toxin
- ГЕМОЛИЗИНЫ (подтип β)
- ФЕРМЕНТЫ: нейраминидаза, муциназа, протеазы и др.

- Эпидемические значимые штаммы холерного вибриона продуцируют как холероген, так и и токсинкоррегулируемые пили адгезии (TCP).
- Продукцию холерогена кодируют гены *ctxAB*, продукцию TCP – ген *tcpA*.
- Ген *tox R* регулирует их экспрессию.



ЛАБОРАТОРНЫЙ ДИАГНОЗ ХОЛЕРЫ

Методические указания
«Лабораторная диагностика
холеры» МУК 4.2.2218-07

Цели бактериологического исследования

- 1. Выявление больных холерой и вибрионосителей.
- 2. Установление окончательного диагноза при вскрытии лиц, погибших от подозрительных на холеру заболеваний.
- 3. Бактериологический контроль за эффективностью лечения больных и вибрионосителей.
- 4. Обоснование этиотропной терапии.
- 5. Контроль за зараженностью внешней среды.
- 6. Контроль за эффективностью обеззараживания в очаге инфекции.

Материал для исследования на холеру:

- МАТЕРИАЛ ОТ БОЛЬНОГО: испражнения, рвотные массы, желчь.
- ОРГАНЫ ТРУПА: отрезки тонкого и толстого кишечника, желчный пузырь, их содержимое.
- ОБЪЕКТЫ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ: предметы, загрязненные испражнениями больного, вода, ил, гидробионты, сточные воды, смывы с различных объектов, пищевые продукты и т. д.

Природные резервуары холерного вибриона





Транспортные среды:

- 1% ПВ рН 8,4;
- 1% ПВ рН 8,4 с теллуридом калия в конечном разведении 1:100000 или 1:200000;
- 2% р-р поваренной соли, разлитый в пробирки по 10 мл.

Комплекс питательных сред

- жидкие среды обогащения
- щелочной агар
- элективные дифференциально-диагностические среды
- набор сред для идентификации холерных вибрионов

Жидкие среды:

- 1% ПВ рН 8,3 (возможно рН 9,5 при отсутствии в лаборатории теллурита калия)
- 10% основной раствор пептона
- 1% ПВ с теллуридом калия в конечной концентрации 1:100000 или 1: 200000
- питательные бульоны рН 7,6 – 8,0 (Мартена, Хоттингера, МПБ, сердечно-мозговой)
- среда, приготовленная из кубиков бульона «Магги» (пропись РосНИПЧИ «Микроб»)

Плотные питательные среды:

- Щелочной агар рН 7,6 – 8,0 – среда для выращивания холерных вибрионов;
- Дифференциально-диагностические среды:
- ТСBS, АЦДС, СЭДХ и др.;
- **Набор сред для идентификации** (Хью-Лейфсона, ПУС, Гисса, Кристенсена и др.). Используются наборы коммерческих ММТ и СИБ № 1;
- Применяют среды производственного выпуска, имеющие контрольный номер ОБТК, или среды, приготовленные по рецептуре и технологии, предусмотренной действующей инструкцией.

Плановые исследования на холеру ведутся по обычному графику работы лаборатории.

При подозрении на холеру и в очаге холеры лаборатории работают круглосуточно.

Схема исследования на холеру материала от больного (испражнений и рвотных масс).

1 этап (0 часов).

- Бактериоскопия:
- - мазки с окраской холерными флюоресцирующими иммуноглобулинами O1 и O139;
- - по Граму.
- Посев в среду накопления – 50-100 мл 1% ПВ. Инкубация при T 37°C 5-6 часов.

- Посев на чашки ЩА – инкубация 12 – 16 часов.
- Посев на элективную среду типа TCBS – инкубация 18 – 24 часа.
- Экспресс-методы: РНГА, РИВ, ИФА, ПЦР.

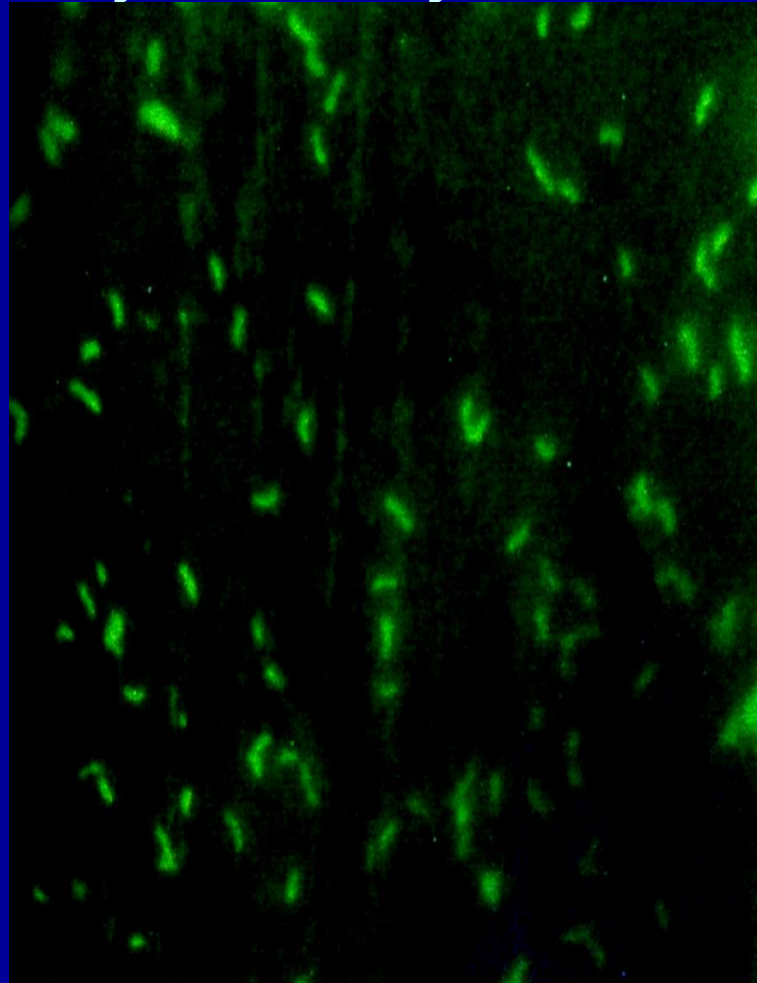
Мазок из чистой культуры холерного вибриона с окраской по Граму



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

Вибрионы (от лат. *vibrio* — вибрировать) — прямые или изогнутые грамотрицательные палочки (0,3–1,3 x 1,4–5 мкм). Подвижны (монотрихи). Факультативные анаэробы. Оптимум роста при pH 8,5–9,0

Свечение клеток холерного вибриона,
окрашенных холерными
флюоресцирующими
иммуноглобулинами.



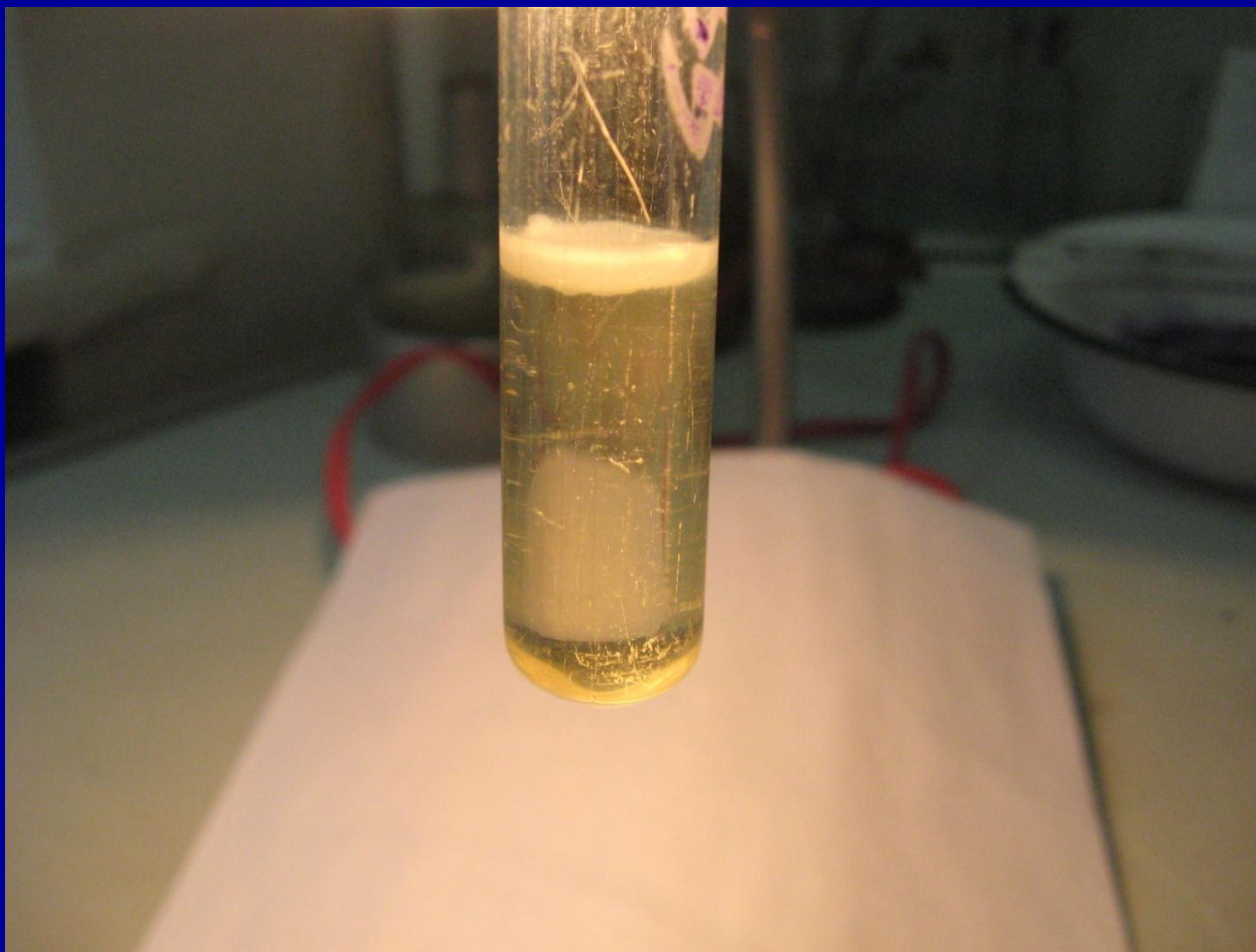
2 ЭТАП (через 6 часов от начала анализа).

Работа с первой средой накопления (1-й ПВ):

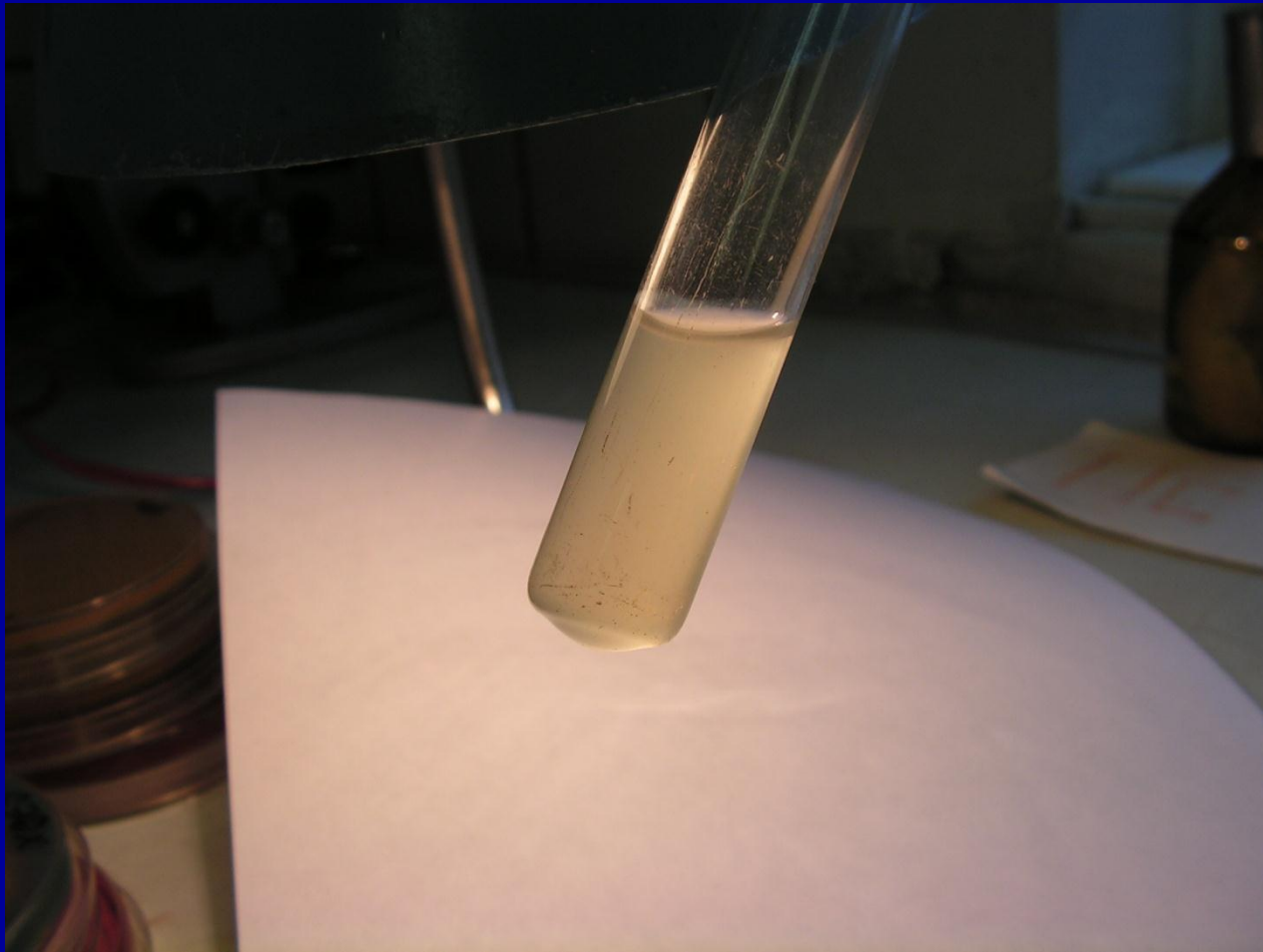
- Высев на ЩА и ТСВС петлей № 5 (d 5 мм) и в две пробирки с 5 – 8 мл 1% ПВ (вторая среда накопления) с поверхностного слоя среды.
- Изучение подвижности возбудителя в препарате висячей или раздавленной капли.
- Постановка реакции иммобилизации вибрионов (РИВ) холерными сыворотками O1 или O139.

- Мазки по Граму и для МФА.
- Возможна постановка экспресс-методов при отрицательных результатах при исследовании нативного материала.

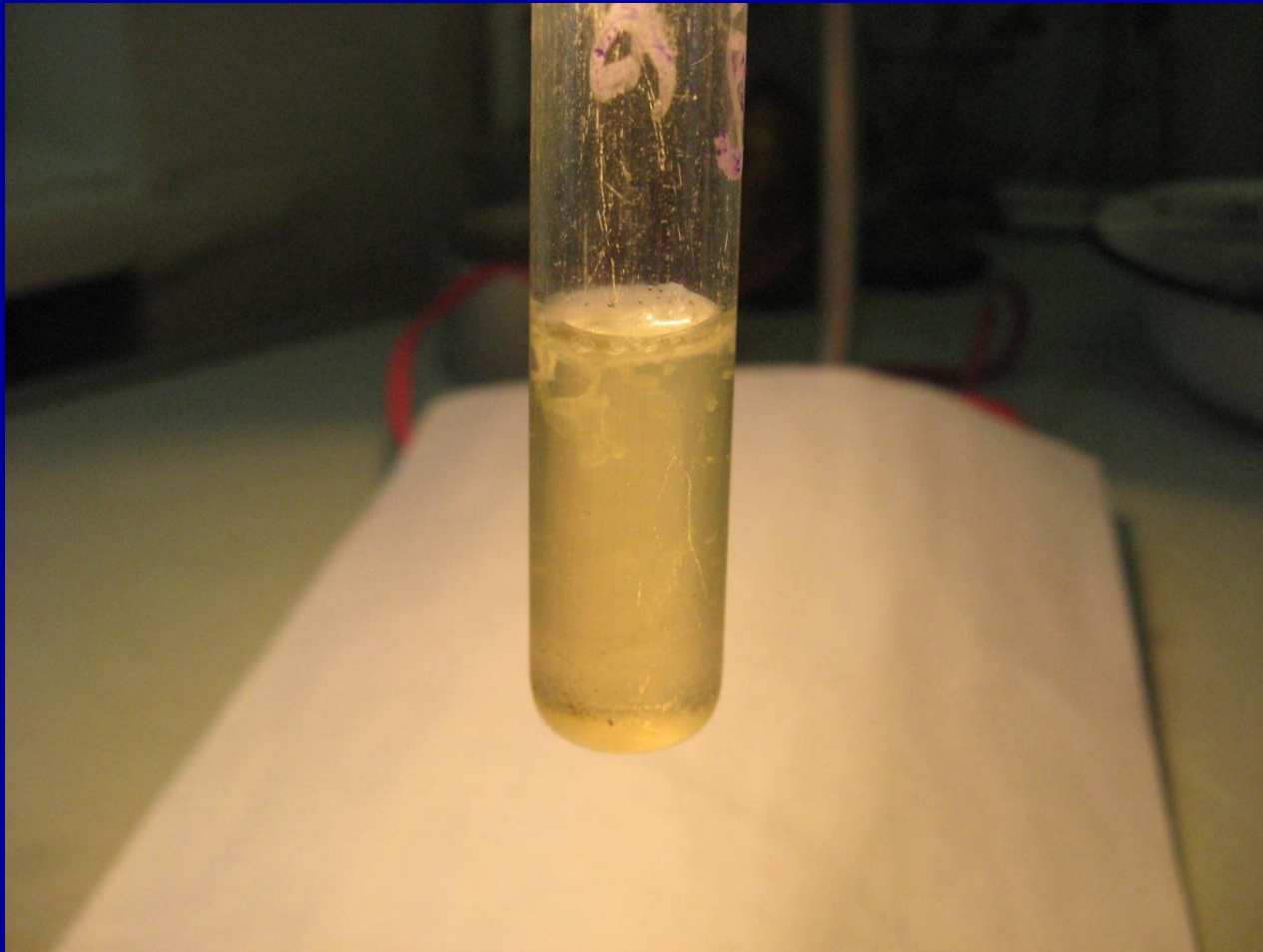
Рост холерного вибриона в 1% пептонной воде (биовар эльтор)



Рост холерного вибриона в жидкой среде (*V. cholerae* non O1/O139)



Рост холерного вибриона O139 серогруппы в 1% П. В.

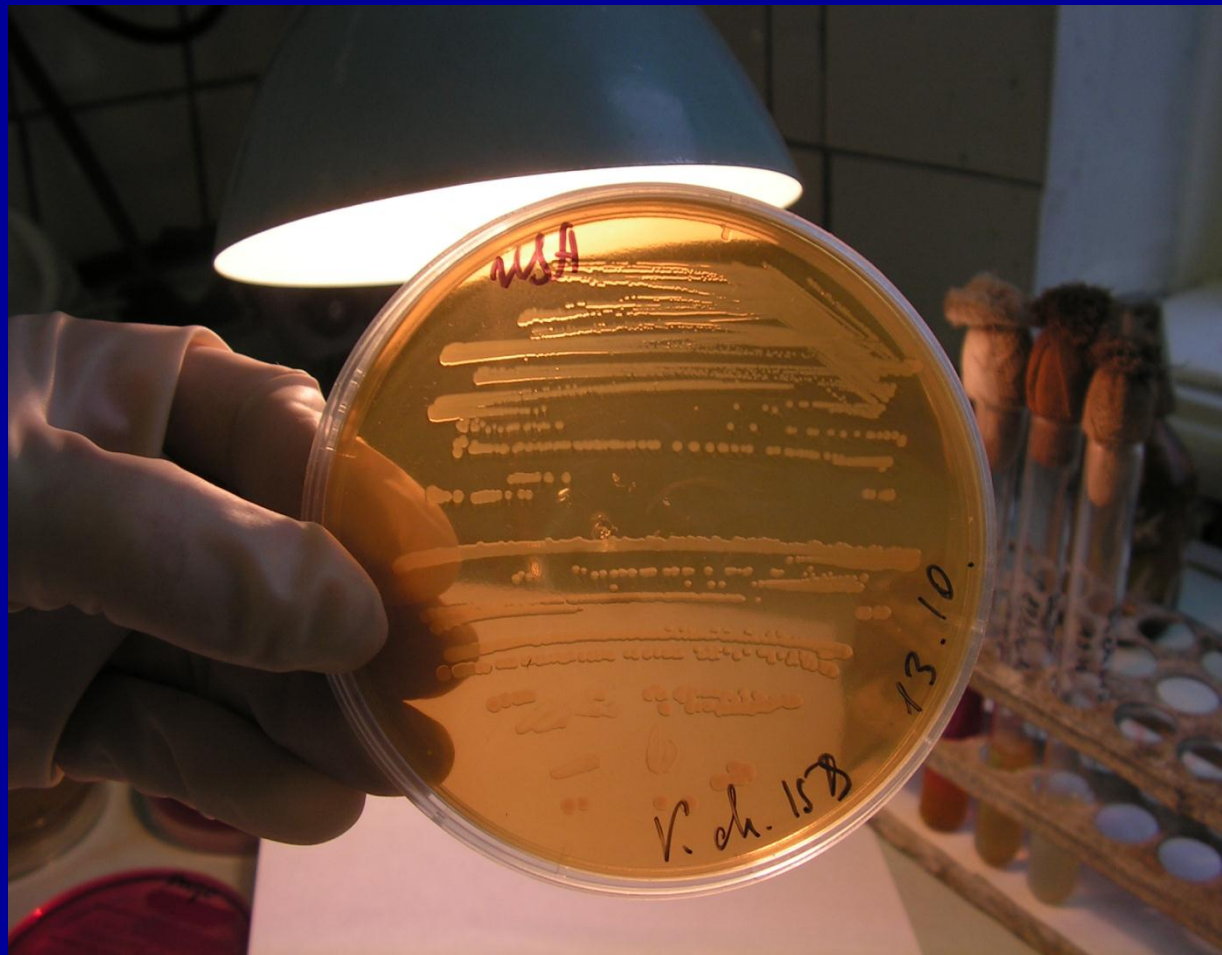


3 этап (через 12-16 часов)

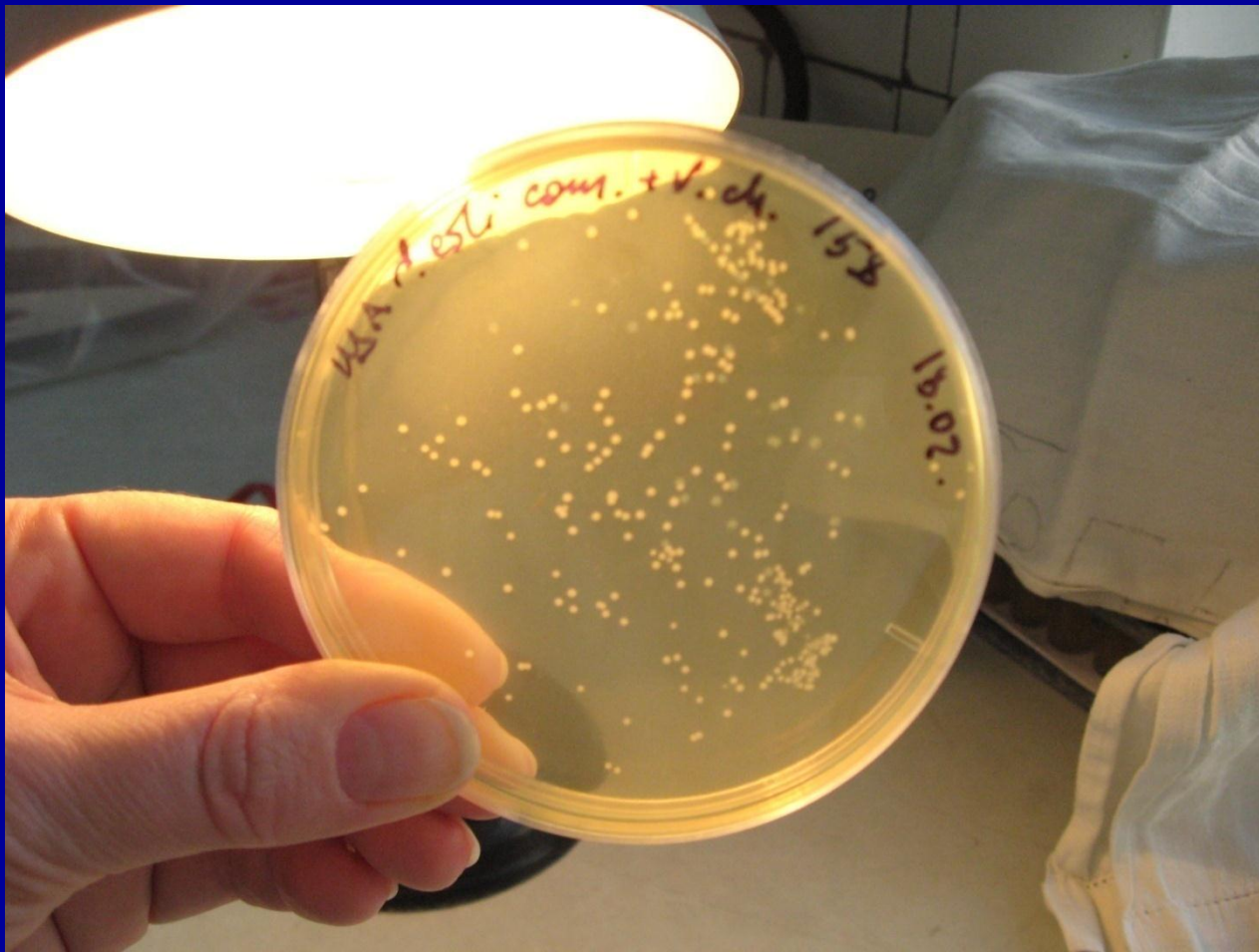
- Высев со 2-й среды накопления на ЩА.
- Отбор подозрительных на холерный вибрион колоний с чашек с посевами нативного материала.
- Проба на ИФО с культурой из подозрительных КЛ.
- Постановка слайд-агглютинации с холерными сыворотками О1 1:50-1:100 в ФР, вариантоспецифическими сыворотками Огава и Инаба 1:100; при отрицательных результатах – РА с сывороткой О139 1:50.

- Приготовление мазков из подозрительных колоний с окраской по Граму и холерными флюоресцирующими иммуноглобулинами O1 и O139.
- Пересев культуры из подозрительных на Х. В. КЛ ИФО+ на чашки ЩА для накопления культуры и на ПУС.

Колонии холерного вибриона на щелочном агаре.



Смесь колоний холерного вибриона и кишечной палочки на ЩА



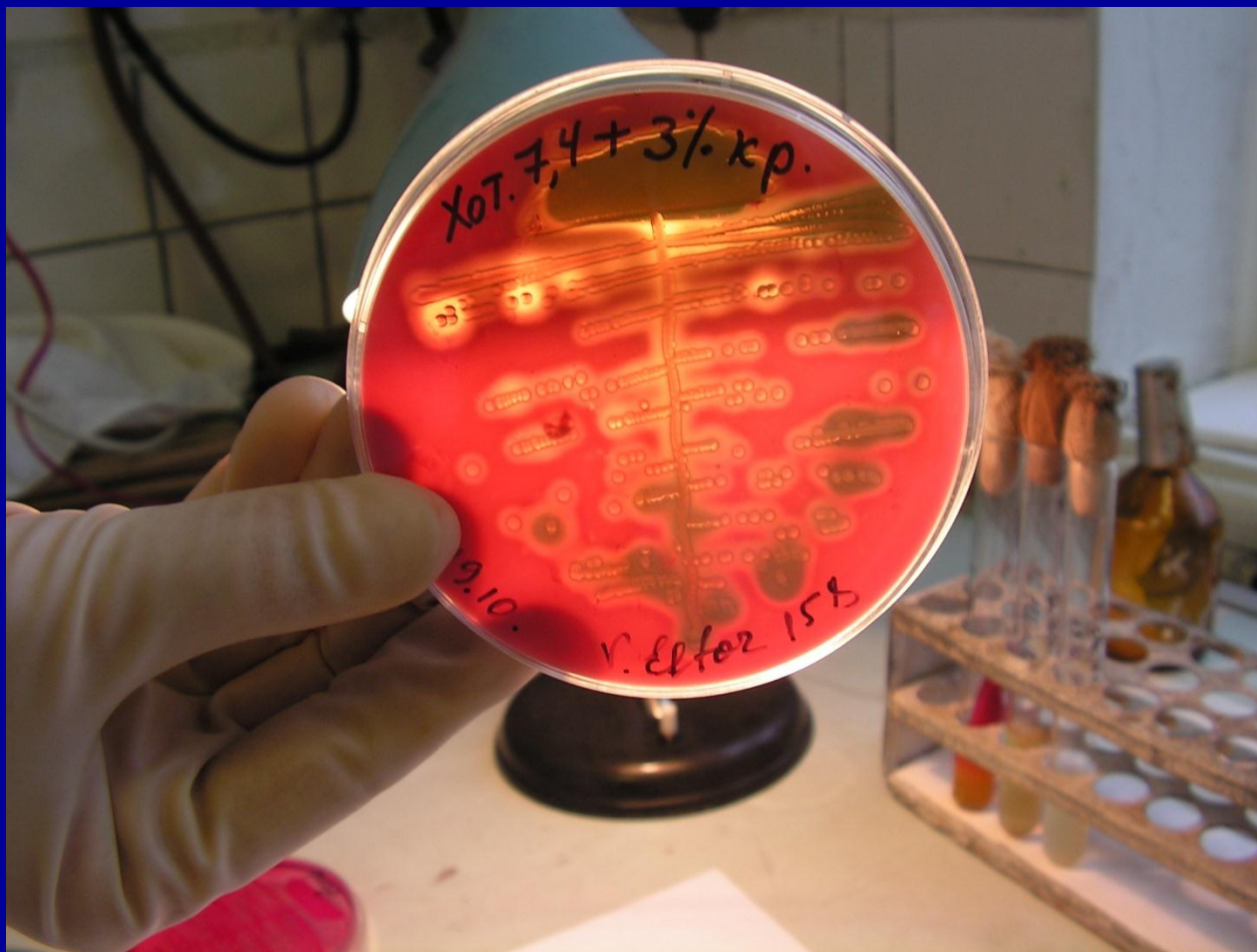
Колонии холерного вибриона O139 серогруппы на ЩА



Колонии холерного вибриона на среде TCBS



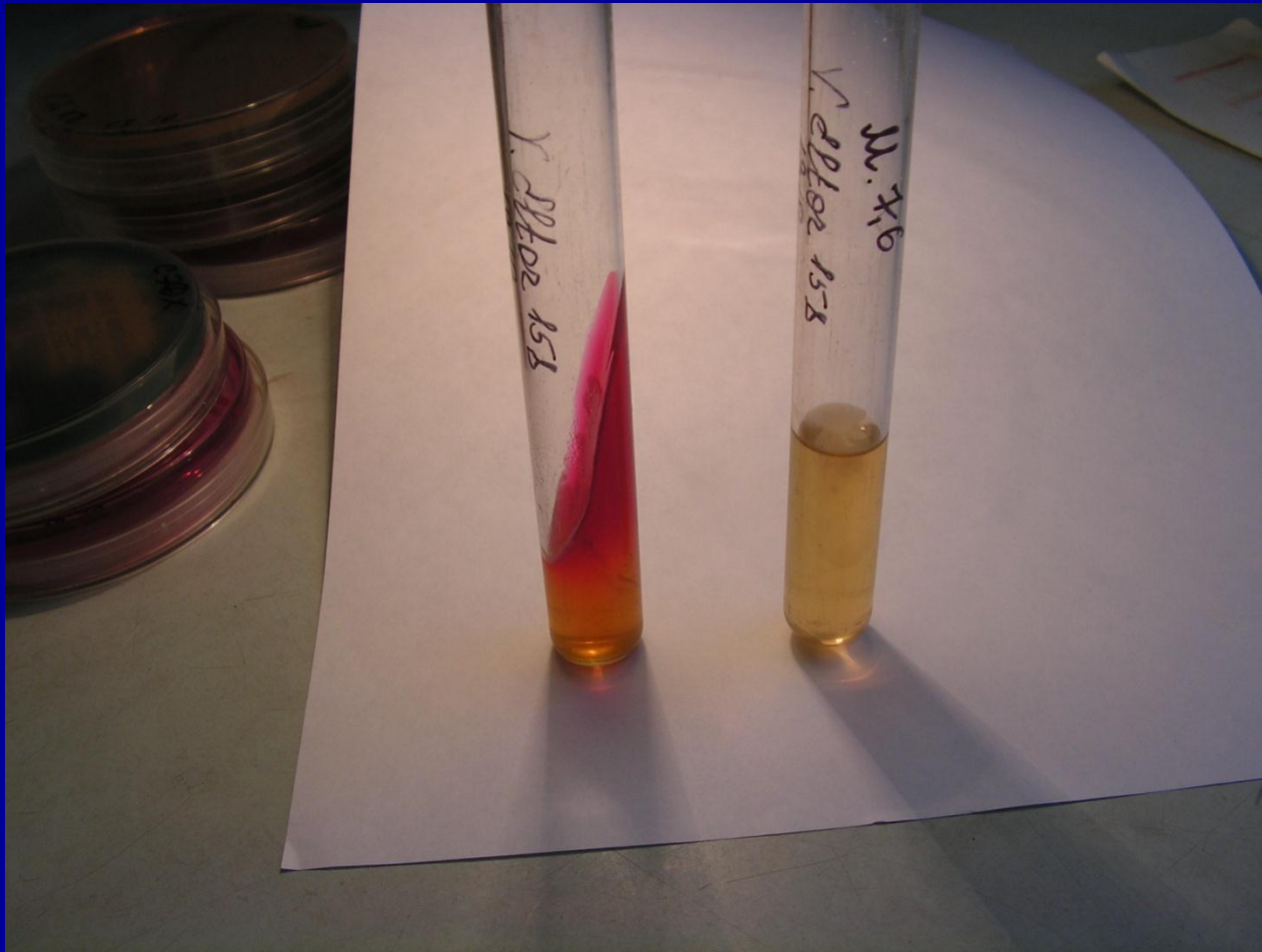
Колонии холерного вибриона на кровяном агаре



Колонии холерного вибриона на среде Эндо через 24 часа инкубации



Рост холерного вибриона на среде Клиггера и в 0,3% п/жидком агаре



4 этап (через 24-36 часов).

- Отбор культур для идентификации.
- Идентификация выделенной культуры (постановка тестов).
- Определение ее эпидзначимости.
- Постановка пробы на чувствительность к антибиотикам методом серийных разведений.

5 этап (через 36-48 часов).

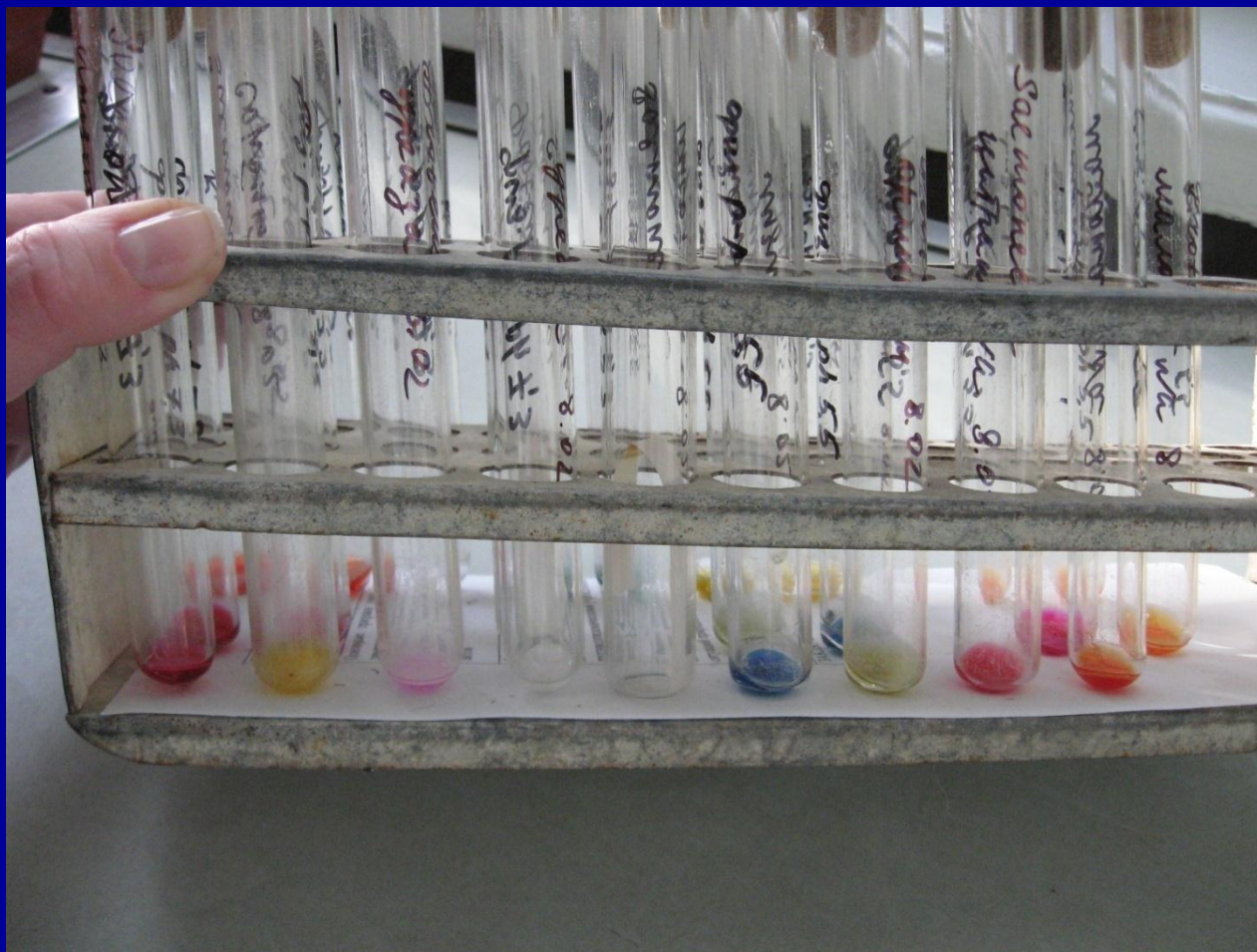
- Учет результатов проб на идентификацию.
- Выдача окончательного ответа о выделении культуры Х. В. соответствующей серогруппы и биовара.
- При выделении культуры Х. В. от больного или вибрионосителя, не агглютинирующейся холерными сыворотками О1 и О139, выдают ответ о выделении Х. В. не О1/О139 серогруппы. При наличии вибрионных агглютинирующих диагностических сывороток определяют принадлежность культуры к другим серогруппам.

Идентификация культур холерного вибриона по сокращенной схеме

- Типичная морфология в мазках;
- Типичные культуральные свойства;
- Положительная слайд-агглютинация с холерными сыворотками O1 или O139;
- Изучение агглютинабельности культуры в развернутой РА с холерными сыворотками O1, Инаба, Огава и РО;
- Определение чувствительности к холерным б/фагам классическому и эльтор методом Грациа;

- Изучение биохимической активности: ферментации глюкозы в среде Хью-Лейфсона, отношения к сахарозе, маннозе, манниту и арабинозе, к лизину, орнитину, аргинину на средах Гисса, СИБ или ММТ;
- Ориентировочная оценка эпидемической значимости по гемолитической активности в пробе Грейга и чувствительности к холерным фагам эльтор stx+ и stx-.

Изучение биохимической активности холерного вибриона с использованием набора СИБ



Возбудителями холеры являются: культуры оксидазо»+», активно подвижных вибрионов, расщепляющие глюкозу до кислоты без газа, декарбоксилирующие лизин и орнитин, не обладающие дегидролазой аргинина, ферментирующие сахарозу, маннозу, маннит и инактивные по отношению к арабинозе, агглютинирующиеся не менее чем до $\frac{1}{2}$ титра сыворотками O1 и одной из вариантоспецифических.

Их относят к *V. cholerae* O1 серовара Инаба или Огава.

Культуры, агглютирующиеся обеими сыворотками не менее, чем до $\frac{1}{2}$ титра (Огава и Инаба), относят к серовару Гикошима.

Для подтверждения принадлежности культуры холерных вибрионов к **O139-й серогруппе** достаточно положительного результата в слайд-агглютинации с сывороткой O139.

Полная схема идентификации культуры холерного вибриона O1 серогруппы

предусматривает дополнительные тесты:

-определяющие принадлежность культуры к **биовару**:

1. Изучение агглютинации эритроцитов куриных или морской свинки;
2. Чувствительности к полимиксину;
3. Продукции ацетилметилкарбинола в реакции Фогес-Проскауэра.

- Определение антибиотикограммы методом серийных разведений;
- Окончательную оценку эпидзначимости по результатам исследования в ПЦР на наличие генов *ctxAB* и *tcrA* и определение токсигенности на модели кроликов-сосунков.

При выделении культур *V. cholerae* O139 их изучают теми же методами, кроме пробы с фагами *ctx*.

Идентификацию атипичных культур, имеющих признаки холерных вибрионов, но не агглютинирующихся сыворотками O1 и O139 серогрупп, выделенных от больных ОКИ, проводят по тестам, определяющим принадлежность к роду *Vibrio* и виду *V. cholerae*.

Тесты принадлежности к роду *Vibrio*

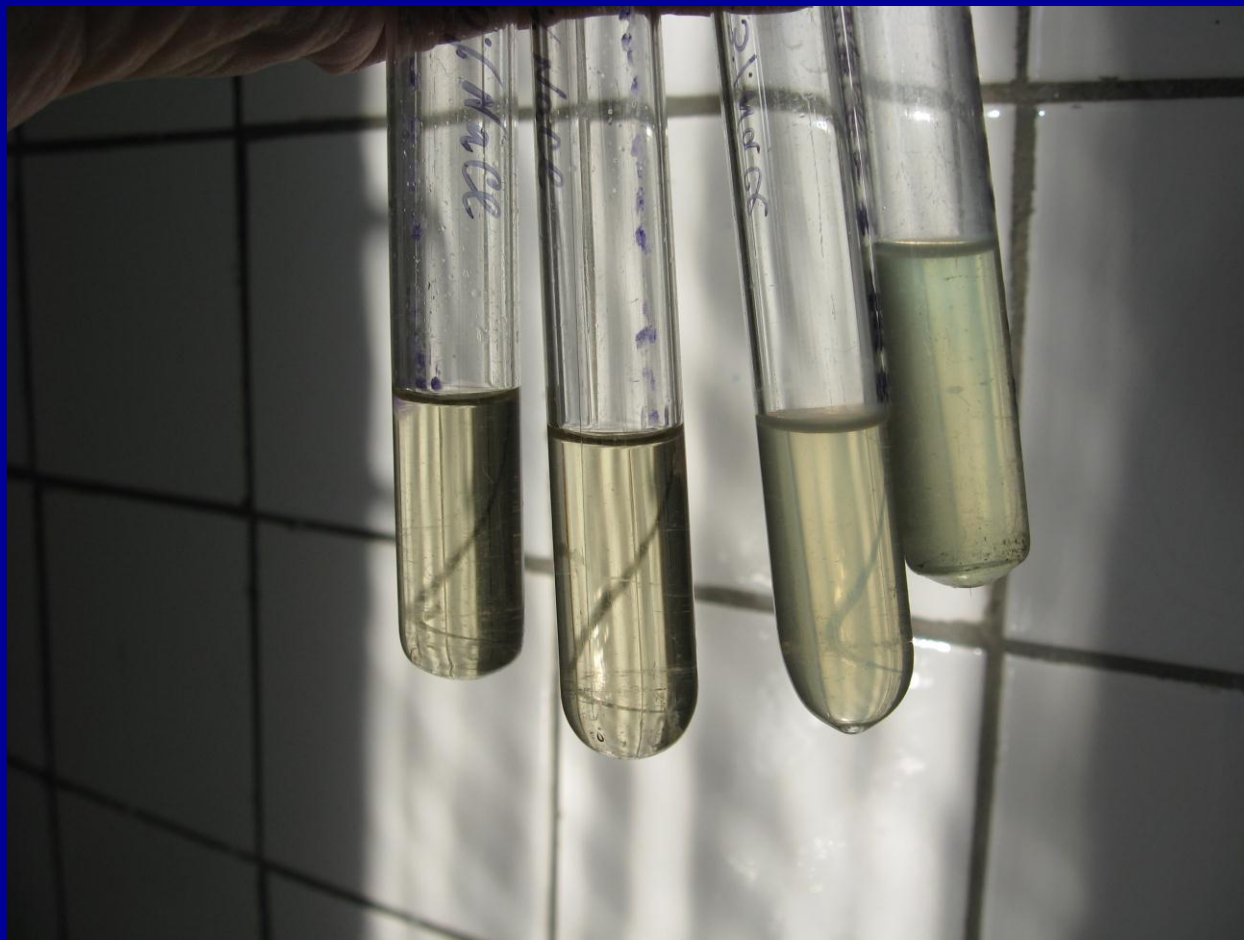
- Наличие индофенолоксидазы;
- Тип расщепления глюкозы в среде Хью-Лейфсона (O/F тест);
- Определение декарбоксилазы лизина и орнитина и дегидролазы аргинина (среды Меллера, Фалькоу, СИБ);
- Уреазная активность (среда Кристенсена);

- Индолообразование;
- Продукция сероводорода;
- Ферментация лактозы, маннита, арабинозы, сахарозы, инозита;
- Образование ацетилметилкарбенола;
- Протеолитическая активность (желатиназа);
- Продукция β -галактозидазы.

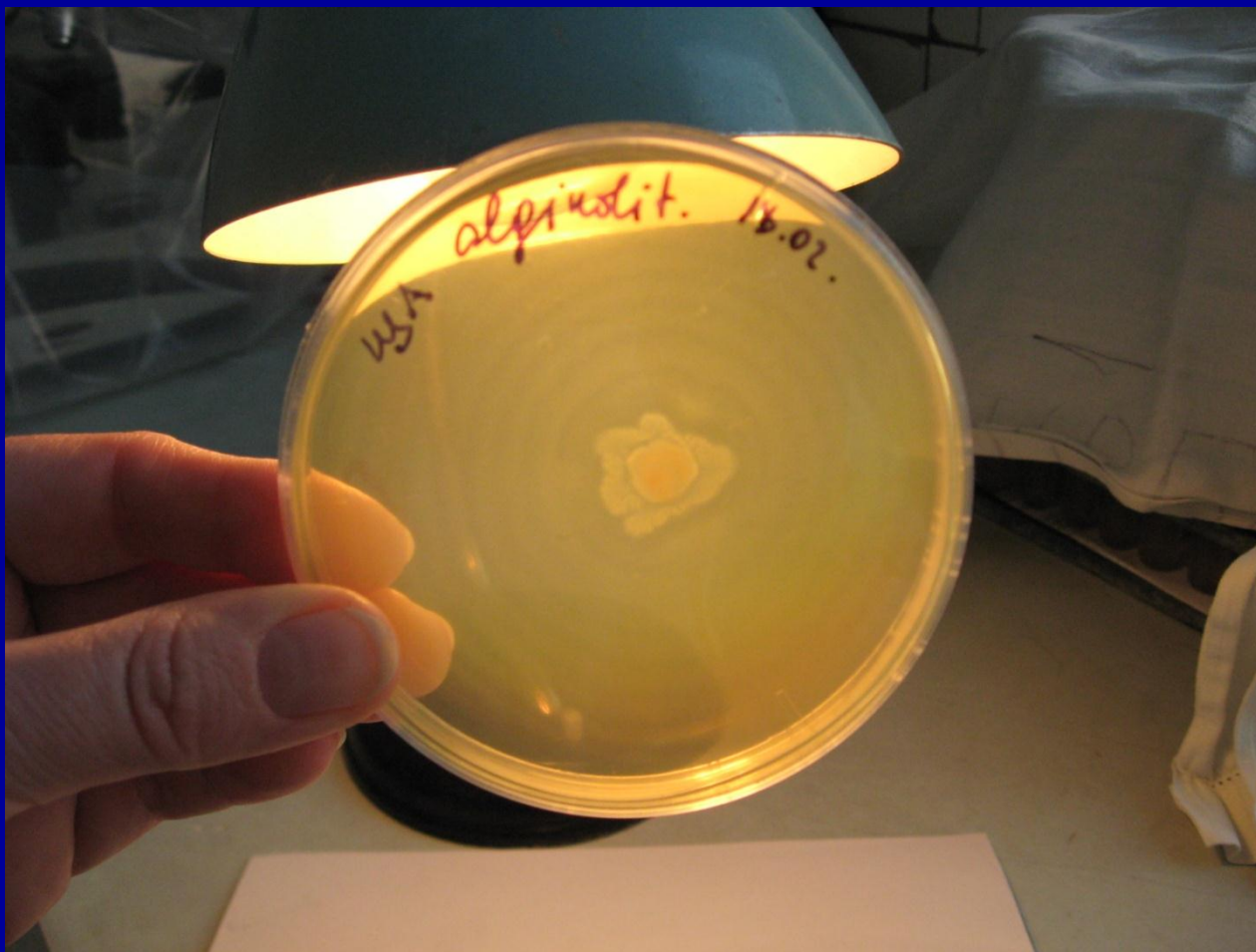
Внутривидовые отличия:

- Биолюминесценция (*V. albensis*);
- Рост в 1% ПВ с различными концентрациями NaCl (0%, 3%, 6%, 10%);
- Способность к роению (*V. alginolitycus*);
- И другие.

Рис.12. Рост холерного вибриона в 1% пептонной воде с различной концентрацией поваренной соли (слева направо: 10%, 7%, 3%, 0,1%).



Феномен роения *V. alginolyticus*



Исследование воды

Отличается только на 1-м этапе.

- Пептонизация пробы воды до получения 1% р-ра пептона добавлением 10% основного р-ра пептона.
- При необходимости - подщелачивание пробы воды 10% водным р-ром NaOH до pH 8,0.
- Инкубация при T 37°C 8 часов.
- Для продления срока инкубации - добавление теллурита калия до конечной концентрации 1:100000 или 1:200000.

Исследование секционного материала

- Посев содержимого кишечника и желчного пузыря, суспензии кусочков слизистой оболочки тонкой кишки в объеме 0,5 – 1 мл пипеткой в 50 – 100 мл 1% ПВ;
- Посев петлей на ЩА и ТСВС.

Методы определения эпидемической значимости холерных вибрионов

- 1. По сопутствующим вирулентности фенотипическим признакам;
- 2. Биологический метод *in vivo*;
- 3. Молекулярно-генетические методы.

1. Известно, что ctx^+ холерные вибрионы не лизируют эритроциты – Hly^- ; и наоборот: $ctx^- Hly^+$.

Изучается гемолитическая активность культуры в пробе Грейга с использованием 1% взвеси эритроцитов барана в ФР.

Определение эпидзначимости холерных вибрионов эльтор комплексным методом.

Сочетание 2-х методов:

- определение чувствительности культуры к б/фагам stx+ и stx-;
- Определение гемолитической активности в пробе Грейга.

2. Биологический метод.

- Определение токсигенности холерных вибрионов на модели кроликов-сосунков.

Используют две заражающие дозы:
100000 и 100000000,

вводят в/кишечно в объеме 0,2 мл 2-м кроликам. Наблюдение 48 часов. При вскрытии оценивают патологоанатомическую картину.

- Токсигенные штаммы вызывают гибель животных в течение 2-х суток с образованием «синдрома холерогенности». Они содержат ген холерного токсина и являются эпидемиологически опасными.
- Энтеропатогенные штаммы вызывают иную картину, не имеют ген *ctx AB* и продуцируют другой диареегенный токсин.
- Атоксигенные штаммы не вызывают заболевания, гибели животных и макроскопических изменений в кишечнике.

Обязательному определению токсигенности на модели кроликов-сосунков подлежат следующие штаммы холерного вибриона O1 и O139 серогрупп:

- **Выделенные от людей:**

- гемолиз »-» O139;

- гемолиз »+» O1 и O139;

- гемолиз »-» O1, атипичные по серологическим свойствам и устойчивые к фагу эльтор и stx+.

- **Выделенные из объектов окружающей среды:**

- гемолиз «-» O1 и O139 при отсутствии эпидосложнений по холере.

3. Молекулярно-генетические методы:

- Метод молекулярного зондирования;
- ПЦР со специфическими праймерами.

Определяется наличие генов *ctxAB* и
tcrA.

