**Занятие 3**

**Микробиологическая диагностика кишечных инфекций (эшерихиоз, брюшной тиф, сальмонеллез)**

**Семейство ENTEROBACTERİACEA**

* Enterobacteriaceae, или семейство Enterobacteriaceae, включает более 20 родов, сходных по морфологическим, тинкториальным и культуральным свойствам. Семейство включает многочисленные патогенные и условно-патогенные бактериальные роды.
* Возбудителями острых кишечных инфекций у человека являются представители рода Escherichia, Shigella, Salmonella. Yersinia pestis вызывает чуму, Y. pseudotuberculosis и Y. enterocolitica — возбудители псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза.
* Enterobacteriaceae - грамотрицательные, неспорообразующие, в основном подвижные (некоторые неподвижные) палочковидные бактерии. Некоторые образуют капсуЯвляются факультативными анаэробами и растут на простых питательных средах. Метаболизм окислительный и ферментативный. Расщепляют глюкозу образованием кислоты, иногда кислоты и газа. Нитраты восстанавливают до нитритов. Каталазоположительны и оксидазоотрицательны.

**Классификация**

**Escherichia coli**

**Семейство : Enterobacteriaceae**

**Род: Escherichia**

**Вид: E.coli**

**Морфология**

**Escherichia coli** – Грамотрицательные, подвижные (перитрихи), образующие микрокапсулу, не образующие спор, короткие палочки

Род **Escherichiae-** культуральные свойства:

* Является факультативным анаэробом, хорошо растет на простых питательных средах при 37°С и рН 7,2-7,6.
* Образует гладкие, слегка приподнятые, блестящие, полупрозрачные колонии на плотных питательных средах.
* в жидких питательных средах образует диффузную мутность и осадок
* на мясо-пептонном агаре образуют гладкие, выпуклые, блестящие, полупрозрачные  
   S- колонии
* на среде Эндо образуют Лактозоположительные малиново-красные колонии с металлическом блеском
* на (EMB- агаре ( Eosin Methylene Blue ) (Среда Левина) образуют темно-фиолетовые колонии

**Escherichia coli (биохимические свойства**)

* **О-антиген** состоит из липополисахаридного комплекса и располагается в клеточной стенке. По этому антигену кишечные бактерии делятся более чем на 170 серогрупп.
* **К-антиген** расположен по сравнению с О-антигеном более поверхностно, поэтому живые культуры кишечной палочки не обладают способностью к агглютинации с О-антителами. К-антиген состоит из типов А, В и L, различающихся по чувствительности к температуре и химическим веществам. Каждый штамм имеет только один тип К-антигена. У эшерихий обнаруживают до 100 разновидностей К-антигена, относящихся к типу В.
* **Н-антиген** связан со жгутиками и обнаруживается только у подвижных штаммов. По этому антигену эшерихии делятся на 75 серотипов.

**Escherichiae coli – (экология)**

* E.coli в основном обитает в кишечнике человека и животных. Является обязательным представителем нормальной микрофлоры кишечника. E.coli попадает в окружающую среду с фекалиями, обнаруживается в объектах внешней среды – почве и воде. Его обнаружение является основным показателем фекального загрязнения почвы и воды. Поэтому E.coli используется в качестве санитарно-индикаторных бактерий в санитарной микробиологии.

**Патогенез**

* **Bнекишечные эшерихиозы**
* сепсис
* Раневые инфекции
* Вторичные пневмонии
* менинигит
* Инфекции мочевыводящих путей (цистит, пиелонефрит)
* Внутрибольничные инфекции
* Пищевые токсикоинфекции
* **Кишечные эшерихиозы**

**Диареегенные штаммы**

**Диареегенные кишечные палочки–** по серологическим маркерам, патогенности и эпидемиологическим характеристикам диареегенные эшерихии делят на 5 групп:

1. **ETEC – ЭНТЕРОТОКСИГЕННЫЕ**
2. **EİEC – ЭНТЕРОИНВАЗИВНЫЕ**
3. **EHEC – ЭНТЕРОГЕМОРРАГИЧЕСКИЕ**
4. **EPEC – ЭНТЕРОПАТОГЕННЫЕ**
5. **EAEC – ЭНТЕРОАДГЕЗИВНЫЕ**

**Энтеротоксигенная кишечная палочка (ЭТКП)**

* Патогенность ЭТКП связана с секрецией энтеротоксина. Этот токсин вызывает дисфункцию эпителиальных клеток тонкой кишки, что приводит к нарушению секреции и всасывания, вызывая диарею. Этот тип диареи называют «секреторной диареей», чтобы отличить ее от других диарей, сопровождающихся разрушением кишечного эпителия.
* Заражение происходит алиментарным путем. Колонизация на поверхности эпителия тонкой кишки обеспечивается пили, которые содержат специальные лектины, называемые CFA (антиген фактора колонизации). Благодаря наличию этих факторов ЭТПК размножается на поверхности эпителия тонкой кишки, секретируя энтеротоксины (термолабильные (ТЛ) и термостабильные (ТС)).

**Энтеропатогенная кишечная палочка (ЭПКП)**

* ЭПКП вызывает диарею у детей в основном в возрасте до одного года. Это заболевание ранее было известно как «токсическая диспепсия». ЭПКП имеет до 20 О-серогрупп, в основном О55, О111, О119, О127, О128 и др. являются представителями серогрупп.
* Заболевания, вызванные ЭПКП, передаются контактным путем и иногда как внутрибольничные инфекции - в отделениях искусственного вскармливания новорожденных и детей, находящихся на грудном вскармливании,
* Патогенность ЭПКП обеспечивают специальные адгезины на поверхности клетки - белки наружной мембраны. Взаимодействие этих адгезинов с кишечным эпителием приводит к накоплению в их цитоплазме филаментозного актина, что приводит к разрушению кишечных ворсинок.

**Энтероинвазивная кишечная палочка (ЭИКП)**

* К ЭИКП относятся представители нескольких O-серогрупп (O28, O112, O124, O136, O143, O144). Заражение происходит алиментарным путем, возможны внутрибольничные инфекции. Преимущественно у детей, иногда у взрослых вызывает диарею, сопровождающуюся дизентерией (слизисто-кровянистый понос), не отличающейся от бактериальной дизентерии.
* Хотя ЭИКП по своим фенотипическим характеристикам схожа с Shigella, такие характеристики, как секреция лизиндекарбоксилазы и ферментация цитрата, отличают их от Shigella и позволяют охарактеризовать их как атипичные эшерихии.

**Энтерогеморрагическая кишечная палочка (ЭГКП)**

* Большинство ЭГКП относятся к серогруппе О157, часть — к О26, О145 и т.д. ЭГКП вызывает геморрагический колит, повреждая толстую кишку, особенно слепую кишку. Основным симптомом является диарея с примесью крови, но в отличие от диареи, вызванной ЭИКП и Shigella, лейкоциты в стуле встречаются редко.
* Источником заболеваний, вызываемых ЭГКП, является зоонозная инфекция крупного рогатого скота. Заражение происходит алиментарным путем – недоваренным мясом или молоком.
* ЭГКП секретирует несколько токсинов цитотоксинового типа. Эти токсины, некоторые из которых представляют собой гемолизины, могут быть обнаружены путем гемолиза на кровяном агаре. Кроме того, ЭГКП секретирует специфические цитотоксины, которые называются веротоксинами или шига-подобными токсинами.

**Энтероадгезивные кишечные палочки (ЭАКП)**

* Главной особенностью ЭАКП является его уникальная адгезия к культуре эпителиальных клеток человека (Hep-2, HeLa). При такой адгезии бактерии прилипают к поверхности эпителия в виде агрегатов, подобных расположению кирпичей в стене. Являются причиной длительной диареи у детей. Колонизируют толстую кишку и секретируют несколько цитокинов.

**Иммунитет**

* Так как формирующийся при эшерихиозах иммунный ответ направлен только против определенного серотипа, его защитный эффект незначителен. Антитела к О-антигенам E.coli относятся к классу IgM, не передаются через плаценту, поэтому у новорожденных отсутствует естественный пассивный иммунитет.

**Микробиологическая диагностика:**

**Материалы для исследования :**

* Испражнения (при кишечных эшерихиозах)
* Моча (при парентеральных эшерихиозах)
* Спинномозговая жидкость
* Раневое отделяемое
* Кровь
* Бактериологический (культуральный) метод
* первичный посев исследуемого материала (кроме крови) на лактозосодержащие дифференциальные среды (Эндо, SS-агар). Посев крови в сахарный бульон в соотношении 1:10, и культивация образцов в аэробных и анаэробных условиях
* инкубация 18-24 часов при температуре 37ºC
* идентификация выросших колоний на основании биохимических свойств. Определение сероваров с помощью поливалентных ОК-сывороток
* определение чувствительности к антибиотикам

**Лечение и профилактика**

* **Лечение** внекишечного эшерихиоза такое же, как и при других гнойно-воспалительных процессах. Для этого важно изучить чувствительность возбудителей эшерихиза к антибиотикам. При инфекциях мочевыводящих путей высокой эффективностью отличаются хинолоны (офлоксацин, ципрофлоксацин, норфлоксацин), производные 8-оксихинолина (нитроксолин-5-НОК), производные нитрофурана (фурагин, фурадонин).
* **Профилактика** - поддержание санитарно-гигиенического режима, осуществление санитарного контроля за водоснабжением, продуктами питания.

**Сальмонеллы (род Salmonella)**

* Род Salmonella семейства Enterobacteriaceae включает более 2000 видов, вызывающих заболевания, называемые сальмонеллезом, у людей и животных.
* Сальмонеллы можно разделить на две группы: монопатогенные и полипатогенные. К монопатогенным сальмонеллам относятся возбудители брюшного тифа и паратифов. Они вызывают заболевания только у людей. Полипатогенные сальмонеллы относятся к бактериям, вызывающим заболевания как у людей, так и у животных.

**Морфо-биологические свойства**

* Представляют собой грамотрицательные палочки размером 0,6 х 0,8 х 1–3 мкм с закругленными концами.
* не образуют капсул и спор.
* подвижны благодаря наличию перитрихиально расположенных жгутиков

**Сальмонеллы - культуральные свойства:**

* Факультативные анаэробы. Не требовательны к питательной среде. Хорошо растут на простых питательных средах при температуре 37°С и рН 7,2-7,6. На плотных питательных средах образуют нежные, гладкие, блестящие, полупрозрачные, слегка выпуклые колонии, на жидких средах - диффузное помутнение. Поскольку сальмонеллы плохо развиваются в первичной культуре, для их получения из патологического материала используют среды обогащения (селенитовый бульон) и селективные питательные среды (желчный бульон).
* **На среде Эндо образуют лактозонегативные бесцветные колонии**
* **на висмут-сульфитном агаре образуют черные колонии**
* **на агаре Мак-Конки образуют лактозонегативные бесцветные колонии**

**Род Salmonella - (биохимические свойства)**

* расщепляют глюкозу, маннит, мальтозу до кислоты и газа (S.typhi только до К),
* не расщепляют лактозу и сахарозу
* образуют сероводород

(кроме S.paratyphi A)

* не образуют индол
* не разжижает желатин

**Salmonella –** (антигенное строение)

* **О-антиген** – состоит из фосфолипидно-белково-полисахаридного комплекса. Термостабилен, инактивируется фенолом. Обладает слабой иммуногенностью. По составу О-антигена все сальмонеллы делятся на более чем 60 О-серогрупп
* **Н-антиген** – связан со жгутиками, белковой природы, обладает выраженной иммуногенностью. Термолабилен, инактивируется спиртом и фенолом.
* **Vi-антиген** (антиген вирулентности) - обнаружен у некоторых сальмонелл (S.typhi и S.paratyphi C). Поскольку Vi-антиген, являющийся вариантом К-антигена, расположен более поверхностно, чем О-антиген, он предотвращает О-агглютинацию бактерий. Полисахарид, термолабильный. Является рецептором для бактериофагов.

**Salmonella –** (классификация)

* Сальмонеллы классифицируются в соответствии с их антигенной структурой. Ранее чаще использовалась классификация Кауфмана-Уайта. В этой классификации по О-антигену сальмонеллы разделены на серогруппы А, В, С и т. д.
* В современной классификации род Salmonella состоит из двух видов. К виду S. enterica относятся сальмонеллы, вызывающие заболевания у людей и животных. Этот вид делится на 6 подвидов, которые в свою очередь подразделяются на серотипы. Другой вид рода — S. bongori не вызывает заболеваний у человека.

**Salmonella –** (факторы патогенности)

* **механизм трансцитоза** - после орального инфицирования сальмонеллы проникают в тонкий кишечник, не повреждая слизистую оболочку, переходят с эпителиальных клеток (М-клеток) на слизистую путем трансцитоза.
* **инвазины** - трансцитоз сальмонелл обеспечивается инвазином, белком наружной мембраны.
* **устойчивость к фагоцитозу** – позволяет сальмонеллам жить и размножаться внутри макрофагов.
* **эндотоксин** – содержит липополисахаридный белок. В случаях бактериемии эндотоксин, высвобождаемый после распада бактериальной клетки, вызывает развитие лихорадки.

**Salmonella –** (заболевания)

* Брюшной тиф (S.typhi)
* Паратиф (S.paratyphi A və B)
* Сальмонеллез (пищевые токсикоинфекции– S.enteritidis, S.typhimurium, S.choleraesuis)
* Септицемия (S.choleraesuis)
* Внутрибольничные инфекции (S.typhimurium)

**Брюшной тиф и паратифы-источники инфекции и пути заражения**

* Источником инфекции являются больные и носители бактерий.
* Заражение происходит по фекально-оральному механизму: возбудители, попадая в окружающую среду с фекалиями, мочой, слюной, вызывают заражение здоровых людей преимущественно через воду, пищу и при бытовых контактах.

**Брюшной тиф и паратифы- патогенез**

* Попадая в пищеварительный тракт, сальмонеллы проходят через слизистую оболочку тонкого кишечника в лимфатические фолликулы и размножаются там в течение инкубационного периода (10-14 дней). В конце инкубационного периода возбудители попадают в лимфу и кровь, вызывая бактериемию и распространяясь по всему организму. Сальмонеллы размножаются в лимфоидной ткани (макрофагах) внутренних органов - печени, селезенке, костном мозге. Переходя из печени в желчные протоки, сальмонеллы размножаются в желчном пузыре (желчь является хорошей питательной средой для сальмонелл), а оттуда, попадая в тонкую кишку, вызывают развитие гиперергического воспаления, что приводит к ее некрозу и образованию язв .

**Брюшной тиф и паратифы- клинические проявления**

* Во время бактериемии выделение эндотоксина в результате распада бактерий вызывает симптомы интоксикации — высокую температуру, головную боль, нарушения со стороны сердечно-сосудистой и центральной нервной системы. С конца второй недели болезни сальмонеллы выделяются из организма преимущественно с калом, мочой, слюной.
* При заболевании отмечают такие осложнения, как кровотечения из язв, образовавшихся в кишечнике, а иногда и прободение кишечника. Воспалительные процессы в желчном пузыре приводят к задержанию здесь сальмонелл и формированию длительно сохраняющейся (иногда несколько лет) бактериемии.

**Иммунитет**

* После перенесенного заболевания формируется стойкий иммунитет. Тем не менее, могут наблюдаться случаи рецидивов заболевания с легким течением. Определенное защитное значение имеют антитела против О- и Vi-антигенов.
* Секреторные IgA-антитела играют роль в местном иммунитете и предотвращают адгезию сальмонелл к эпителию кишечника.

**Микробиологическая диагностика**

Материалы для исследования :

* Кровь (для получения гемокультуры в первые 2 недели заболевания)
* Испражнения (копрокультура)
* Моча (уринокультура)
* Дуоденальное содержимое (при бактерионосительстве)
* Бактериологический метод (культуральный)
* В течение лихорадочного периода производят забор и посев **крови** в желчный бульон с последующим пересевом на дифференциальные среды (Эндо, Плоскирева, ВСА) с целью получения чистой культуры.
* Идентификация выросших колоний по биохимическим свойствам и антигенной структуре
* Определение чувствительности к антимикробным препаратам
* Серологический метод
* **Реакция Видаля**–начиная со 2-ой недели заболевания в сыворотке крови определяют антитела к возбудителю. При помощи реакции Видаля определяют антитела к О- и Н- антигенам
* **РПГА** с O-, H-, Vi- диагностикумами
* **Специфическая профилактика-**

Специфическую профилактику брюшного тифа проводят пероральной живой вакциной - авирулентным мутантным штаммом S.typhi.

* **Лечение -**

этиотропное лечение проводят антибиотиками - ампициллином, сульфометаксизол-триметопримом (бисептолом), цефалоспоринами III поколения.

**Механизмы антибиотикорезистентности микроорганизмов**

**Определение синтеза ESBLв микроорганизмах (фенотипический тест)**

* Диск, содержащий ингибитор фермента бета-лактамазы и антибиотик (например, диск амоксициллин + клавулановая кислота), помещают непосредственно рядом с диском бета-лактамного антибиотика (например, цефепим), помещенным на поверхность твердой питательной среды, инокулированной бактериальной культурой.
* Результат оценивают через сутки инкубации.
* Если бактериальный штамм синтезирует ESBL, стерильная зона вокруг диска цефепима распространяется по направлению к диску амоксициллин+клавулановая кислота.

**Сальмонеллёзы (пищевые токсикоинфекции)**

* **S.enteritidis**
* **S.typhimurium**
* **S.choleraesuis**

Источником инфекции являются животные и птицы, а также больные сальмонеллезом. Заражение происходит при употреблении мяса и мясных продуктов, рыбы, яиц, молока и молочных продуктов, содержащих сальмонеллы. Более опасны пищевые продукты, в которых размножаются сальмонеллы. Это вызывает накопление сальмонелл в продуктах.

**Сальмонеллез (пищевые токсикоинфекции):** патогенез и клиника

* Сальмонеллы, попавшие в пищеварительный тракт через пищу, внедряются в слизистую оболочку тонкой кишки из М-клеток по механизму трансцитоза и перемещаются в подслизистую оболочку. Здесь часть сальмонелл захватывается макрофагами и попадает в лимфатические фолликулы, где размножаются и образуют первичный очаг инфекции. Остальные сальмонеллы размножаются в подслизистом слое. Их разрушение приводит к выделению эндотоксина. После короткого инкубационного периода (12-48 часов) воздействие эндотоксина на эпителий кишечника и всасывание в кровь вызывает симптомы заболевания - рвоту, диарею (слизистую, кровянистую), токсикоз, лихорадку.

**Сальмонеллез (пищевые токсикоинфекции):**

* Иммунитет - кратковременный. Поскольку он специфичен для серотипа, возможны повторные инфекции.
* Микробиологическую диагностику проводят бактериологическим методом. Исследуются рвотные массы, промывание желудка, кал, желчь, моча и кровь (при генерализованной форме заболевания).
* Профилактика - проводится санитарно-ветеринарный контроль для предотвращения распространения возбудителей среди сельскохозяйственных животных и птиц. На мясоперерабатывающих предприятиях санитарный контроль осуществляется за убоем животных, хранением мяса и мясных продуктов, приготовлением пищи в кулинарных заведениях.

**Микробиологическая диагностика**

Материалы для исследования

* Промывные воды желудка
* Рвотные массы
* Испражнения
* Желчь
* Моча
* Кровь (при генерализованных формах)
* Бактериологический (культуральный )
* посев исследуемого материала на лактозосодержащие дифференциальные среды (Эндо, SS-агар, Левина, Плоскирева, Мак Конки)
* инкубация 18-24 часов при температуре 37ºC
* идентификация выросших лактозонегативных колоний по морфологическим, биохимическим свойствам и антигенной структуре
* определение чувствительности к антибиотикам

**Внутрибольничные (нозокомиальные) сальмонеллезы**

* Нозокомиальный сальмонеллез чаще всего вызывается S. typhimurium. В настоящее время также обнаруживаются внутрибольничные инфекции, вызываемые S.enteridis, S.infants, S.derby и другими сальмонеллами. По своим морфологическим и культуральным признакам они не отличаются от других сальмонелл. Однако госпитальные штаммы сальмонелл принадлежат к определенным биоварам и отличаются более высокой вирулентностью. Как правило, они обладают полирезистентностью к антибиотикам, обеспечиваемой конъюгативными R-плазмидами.

**Источником инфекции** в основном являются бактерионосители, а иногда и больные. **Заражение** происходит контактным (с рук персонала, предметами ухода за больными), иногда воздушно-пылевым путем (при вдыхании частиц пыли, адсорбировавших сальмонеллы), и алиментарным путем.

* Ослабление резистентности организма играет важную роль в патогенезе внутрибольничного сальмонеллеза. Поскольку возбудители попадают в организм разными путями, могут развиваться различные патологические процессы – нарушения в желудочно-кишечном тракте, пневмония, бактериемия, септические осложнения.
* **Иммунитет** зависит от серотипа.
* **Профилактика** – важно строго соблюдать противоэпидемический режим в лечебных учреждениях.
* **Лечение** – антибактериальная терапия проводится с учетом чувствительности возбудителей.