

КАЗАНСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ



Микробиология
инфекций, вызываемых
энтеробактериями.
Шигеллы, сальмонеллы,
иерсинии

Зав. каф. микробиологии имени
академика В.М. Аристовского Исаева
Гузель Шавхатовна

ШИГЕЛЛЫ

- Род *Shigella* – типовой вид, возбудитель дизентерии *Shigella dysenteriae*. Род назван в честь Киесе Шига, описавшего типовой вид. Позднее были обнаружены другие возбудители дизентерии, так же принадлежащие к этому роду.
- Бактерии рода *Shigella* – это короткие грамотрицательные бактерии длиной 2-4 мкм и шириной 0,5-0,8 мкм, неподвижны, не имеют жгутиков и капсул, не образуют спор или пигмента, хорошо окрашиваются анилиновыми красителями. Спор и капсул не образуют. Оптимальное значение pH для роста 6,7-7,2. Температурный оптимум роста +37°C. При температуре выше +45°C рост прекращается.





Таксономия

Согласно современной классификации, различают 4 вида шигелл:

- *S. dysenteriae* включает в себя 12 сероваров (1-12). Среди них хорошо известные бактерии Григорьева-Шига;
- *S. flexneri* - 6 сероваров (1-6), каждый из которых включает по два подсеровара (a, b). Серовар 6 (Ньюкастл) не имеет подсероваров, но его подразделяют на 3 биохимических типа. Кроме того, вид *S. flexneri* включает два антигенных варианта - X и Y, у которых нет типовых антигенов;
- *S. boydii* содержит 18 сероваров (1-18);
- *S. sonnei* включает лишь один серовар. Для внутривидовой дифференцировки используется деление на биохимические типы и подтипы.

Этиологическая роль различных шигелл неодинакова. Наибольшее значение в большинстве стран мира имеют шигеллы Зонне и шигеллы Флекснера.

Sh. dysenteriae

1-12 серотипы

Sh. flexneri

1-6 серотипы,
вариант X, вариант Y
(подсеротипы:
1a,2b,2a,2b,3a,
3b,3c,4a,4b)

Sh. boydii

1-18 серотипы

Sh. sonnei

Подгруппа А
не ферментирует
маннит

Подгруппа В
обычно ферментирует
маннит

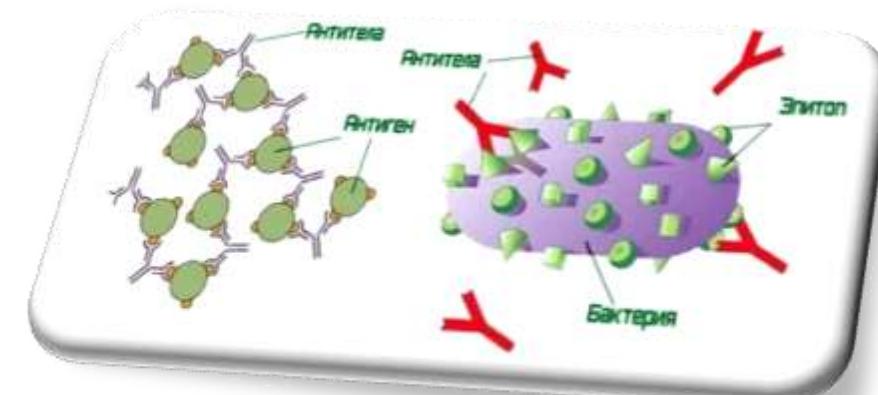
Подгруппа С
обычно ферментирует
маннит

Подгруппа D
обычно ферментирует
маннит, поздно лактозу
и сахарозу

Антигенная структура шигелл

- **O-антиген** - соматическим термостабильный, липополисахарид клеточной стенки и является групповым. В основу серотипирования положены различия в структуре O - Аг. Каждому виду рода соответствует отдельная серогруппа, обозначаемая заглавными латинскими буквами. Серовары и подсеровары обозначают арабскими буквами (a,b,c). Серовароспецифические (типовы) Аг обозначают римскими цифрами (I -VI), групповые арабскими (3,4;6;7,8).
- **K-антиген** - капсулный антиген - поверхностные полисахариды, термолабильный, маскируют O-антигены и препятствуют агглютинации бактерий O-антисыворотками.
- **K-антигены отсутствуют** у шигелл Зонне и Флекснера.

Основным фактором патогенности шигелл является способность их к токсикообразованию. Шигеллы имеют эндотоксин, который связан с O-антигеном клеточной стенки. Бактерий и выделяется при их разрушении. К тому же, эндотоксинам шигелл присущ особый тропизм к эпителию слизистой оболочки толстой кишки.



Факторы патогенности

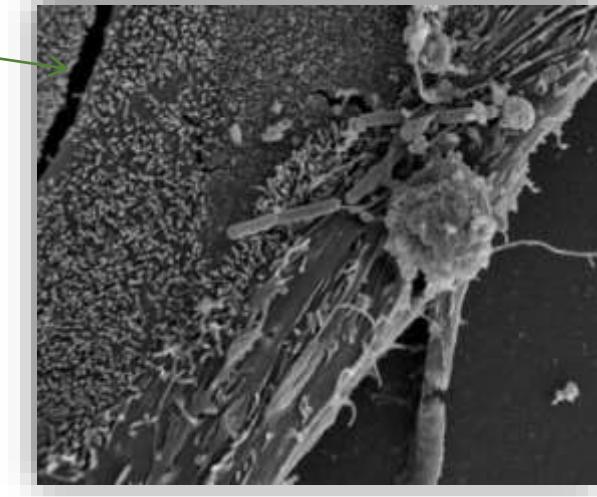
Пили и белки наружной мембранны – способствуют адгезии бактерий на эпителиальных клетках и их инвазии в клетки эпителия.

Ферменты патогенности: гиалуронидаза, муциназа, нейраминидаза – разрушают слизь, способствуют **адгезии и колонизации**.

Эндотоксин (ЛПС) – термолабильный энтеротоксин вызывает нарушение транспорта электролитов, аккумуляцию жидкости в подслизистой, формирование очагов некроз.



Шигеллы внутри клетки человека; ядро клетки окрашено красным, бактерии – синим. (Фото Stephanie Schuller).



Шига и шигаподобные токсин – более известный как веротоксин, проявляет цитотоксическую (в том числе и гемолитическую активность), вызывает развитие микроангиопатических нарушений, ассоциированных с геморрагическим колитом и гемолитико-уре米ческим синдромом.



Эпидемиология и патогенез

Источником инфекции является человек, больной различными формами шигеллезов, в том числе и бессимптомными.

Поступление шигелл в организм сопровождается гибелью части бактерий в желудке и кишечнике вследствие воздействия желудочного и других пищеварительных соков. Микроорганизмы *Shigella* проникают через слизистую оболочку ободочной кишки, что вызывает секрецию слизи, гиперемию, лейкоцитарную инфильтрацию, отек и часто поверхностные изъязвления слизистой оболочки. Жизнедеятельность, а также гибель шигелл в тонкой кишке сопровождается продукцией токсинов. Симптомы интоксикации, а также боли в животе, возникающие в начальном периоде болезни, во многом обусловлены именно действием Шига токсина. Нарушения, вызванные поражением шигеллами тонкого и толстого кишечника, определяют развитие диарейного синдрома, и иногда гемолитико-уремический.

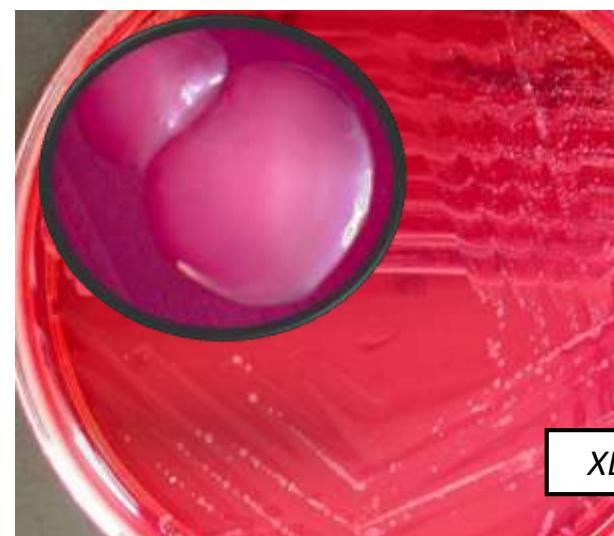
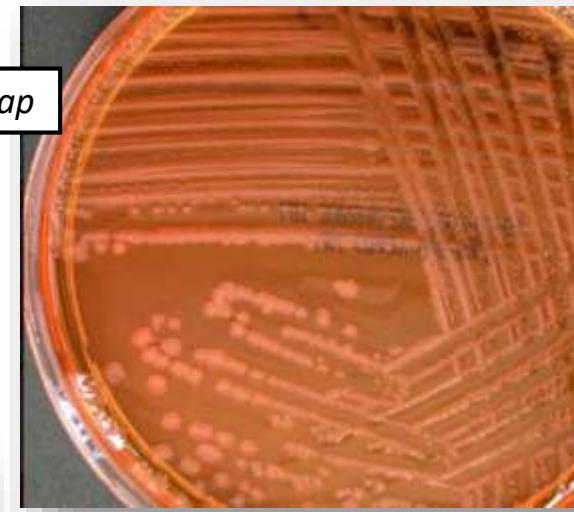
Механизм передачи инфекции - фекально-оральный, который реализуется контактно-бытовым, пищевым и водным путями. Факторами передачи заразного начала могут быть немытые руки, инфицированные предметы обихода, различные пищевые продукты, особенно молочные, вода из открытых водоисточников. Дизентерия распространена повсеместно, но особенно там, где нарушаются технология приготовления пищи, загрязняются готовые продукты, водоисточники. Болеют люди всех возрастных групп. Но наиболее подвержены этому заболеванию лица с выраженным иммунодефицитом и трофической недостаточностью, а также дети дошкольного возраста.



Культуральные свойства шигелл

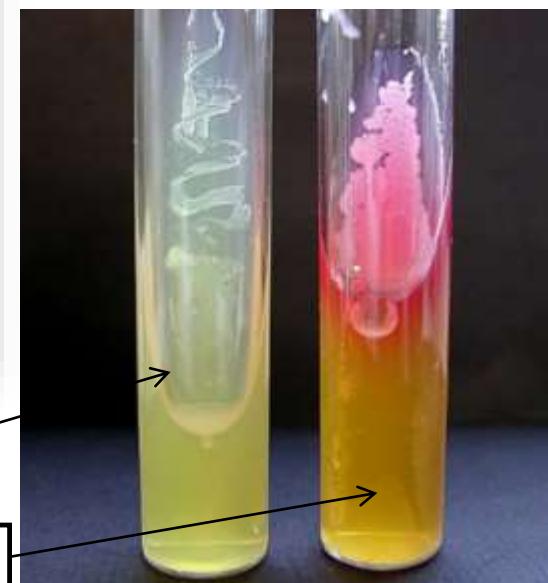
- Шигеллы - факультативные анаэробы. Неприхотливы к питательным средам. Размножаются на МПА и МПБ при температуре 37°C и pH 7,2-7,4. Элективными и дифференциально-диагностическими средами для них являются среды Плоскирева, Эндо, МакКонки, XLD-агар. Растут в виде бесцветные лактозоотрицательные полупрозрачных круглых колоний, размером 15-20 мм в S-форме. Исключением являются шигеллы Зонне, которые часто диссоциируют, образуя крупные, плоские, мутные, с изрезанными краями колонии R-формы.
- В жидких питательных средах шигеллы дают равномерную муть, R-формы образуют осадок.

Культуральные свойства шигелл



мочевина отриц

Среда Олькеницкого





Биохимические свойства шигелл

Ферментативные свойства шигелл менее выражены, чем у других представителей *Enterobacteriaceae*: они расщепляют углеводы без газообразования, не расщепляют лактозу и сахарозу. Исключением являются шигеллы Зонне, которые на 2-3 сутки расщепляют эти углеводы.

Протеолитические свойства у шигелл мало выражены - образование индола и сероводорода непостоянно, молоко они свертывают, желатин не разжижают.



Лабораторная диагностика шигеллезов

Клинический материал: испражнения, ректальный мазок.

Методы:

Бактериологический (культуральный метод) – основной. Проводят в кратчайшие сроки – «у постели больного».

Предварительный этап. Посев в селенитовый бульон.

1 этап: посев клинического материала или пробы из селенитового бульона на среды Эндо, Плоскирева и др.

2 этап: макро- и микроскопическое изучение колоний пересев лактозоотрицательных колоний на среды Ресселя или Клиглера.

3 этап: идентификация по совокупности свойств: культуральных, морфологических, тинкториальных; биохимических.

Серологический метод (вспомогательный) (латексагглютинация, ИФА, РСК, РНГА, развернутая реакция агглютинации – «дизентерийный Видаль») для обнаружения антител в сыворотке больного при хронических, атипичных формах и с целью ретроспективной диагностики, а также для обнаружения экзотоксинов

Молекулярно-генетический метод - ПЦР



САЛЬМОНЕЛЛЫ

Род *Salmonella* получил название по имени

Даниала Элмера Сальмона, который в 1885 г.

Описал микроорганизм, выделенный из свиньи
и известный в настоящее время под названием

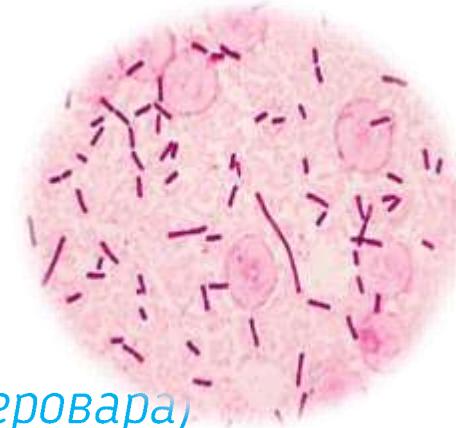
«серовар *S. choleraesuis*». Род *Salmonella* представлен двумя
видами: *S. enterica* (около 2600 сероваров) и *S. bongori* (22 серовара)

Большинство сероваров рода *Salmonella* относятся к виду *S. enterica*.

Возбудитель брюшного тифа *Salmonella Typhi*.

Возбудители паратифов серовары: *Salmonella Paratyphi A*, *Salmonella Paratyphi B*.

Сальмонеллы - грамотрицательные палочки 0,7-1,5x2-5 мкм, имеют от 8 до 20
жгутиков, подвижны, спор не образуют, факультативные анаэробы, хорошо растут на
питательных средах. Оптимум pH составляет 7,2-7,4, оптимальная температура
культивирования 37 С. Антигенная структура сальмонелл достаточно сложна, в
настоящее время выделяют O-, H-, Vi-, M-, K-антигены.



Классификация сальмонелл

- Подвиды *S.enterica* (2 557 сероваров)
- I подвид *enterica* (1531 сероваров)
- II подвид *salamae* (505 сероваров)
- IIIa подвид *arizonae* (99 сероваров)
- IIIb подвид *diarizone* (336 сероваров)
- IV подвид *houtenae* (73 серовара)
- VI подвид *indica* (13 сероваров)
- V вид *S.bongori* (22 серовара)

Эпидемиологическое значение сероваров:

Естественный резервуар сальмонелл подвидов I и II – теплокровные животные

Для остальных – хладнокровные животные и окружающая среда



Антигенная структура сальмонелл

Сальмонеллы внутри рода идентифицируют по антигенной структуре, выявляемой в реакции агглютинации на стекле с монорецепторными *O*- и *H*-агглютиниирующими сыворотками.

У сальмонелл различают два основных антигенных комплекса: *O*-антиген - соматический, состоит из *R*-ядра и боковой *S*-цепи. К *S*-цепи присоединяются сахара, которые называются рецепторами и обозначаются цифрами;

H-антиген - жгутиковый (отсутствует у неподвижных штаммов). Последний имеет две фазы. Фазу I обозначают буквами, ее считают специфической, фазу II - цифрами, ее принято считать неспецифической. Некоторые серовары сальмонелл, в частности *S. Turphi*, имеют полисахаридный *Vi*-антиген, служащий разновидностью К-антигена. *Vi*-антиген может придавать бактериям явление *O*-инагглютинальности

В настоящее время известно более 2200 серологических вариантов сальмонелл, каждый из которых характеризуется определенной комбинацией *O*- и *H*-антигенов, что позволяет определить серовар возбудителя.

Антигенная структура сальмонелл

Имеется несколько классификаций сальмонелл, наиболее старая – классификация по Кауфману-Уайту, разработанная в 1934 г. В основе этой классификации лежит подразделение сальмонелл на серологические группы

по общности строения

О-антисыворотки и внутри

серогруппы – на серовары

в соответствии с различиями

в строении Н-антисыворотки



Классификация сальмонелл по антигенней структуре (по Кауфману-Уайту)

Название серовара	Серогруппа	Антисыворотка		
		О	Н	
			Фаза 1	Фаза 2
<i>S.paratyphi A</i>	A	1, 2, 12	a	-
<i>S.derbi</i>	B	1, 4, 5, 12	f, g	1, 2
<i>S.haifa</i>		1, 4, (5), 12	z ₁₀	1, 2
<i>S.paratyphi B</i>		1, 4, 5, 12	b	1, 2
<i>S.typhimurium</i>		1, 4, 5, 12	i	1, 2
<i>S.infantis</i>	C ₁	6, 7	R	1, 5
<i>S.choleraesuis</i>		6, 7	c	1, 5
<i>S.virchov</i>		6, 7	R	1, 5
<i>S.newport</i>	C ₂	6, 8	eh	1, 2
<i>S.dublin</i>	D	1, 9, 12 (vi)	g, p	-
<i>S.enteritidis</i>		1, 9, 12	g, m	-
<i>S.panama</i>		1, 9, 12	e, v	1, 5
<i>S.typhi</i>		9, 12 (vi)	d	-
<i>S.anatum</i>	E ₁	3, 10	ch	1, 6

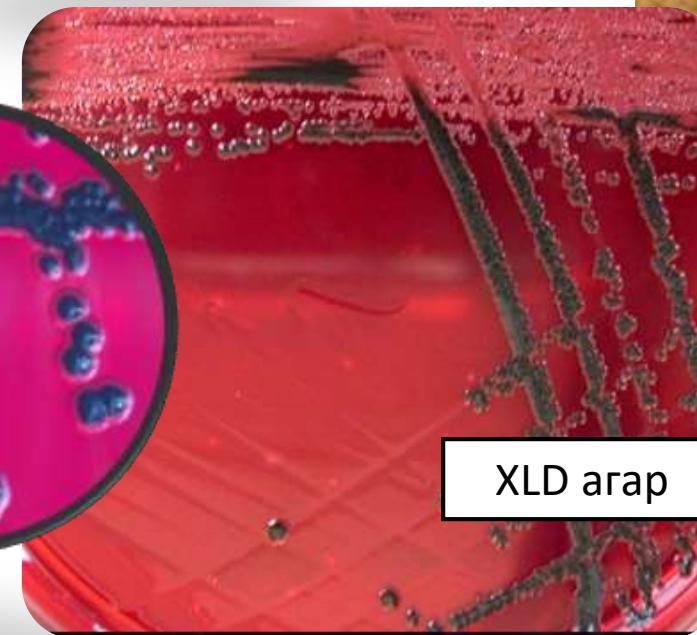
Среды для выделения сальмонелл

- Среды обогащения:
- Неселективные (забуферная пептонная вода)
- Селективные (бульон Раппапорт -Василиадиса с соей (RVS), модифицированный полужидкий агар Раппапорт - Василиадиса, бульон Мюллера -Кауфмана, магниевый, селенитовый бульон)
- Слабоселективные: Эндо, Мак-Конки, агар с бриллиантовым зеленым
- Высокоселективные: Бактоагар Плоскирева, Сальмонелла-Шигелла агар, ксилозо-лизин-дезоксихалатный агар, Рамбах агар, Висмут-сульфитный агар, Гектоен - агар

Культуральные свойства сальмонелл



Агар Мак Конки





Биохимические свойства сальмонелл

Обладают высокой сахаролитической активностью; для установления родовой принадлежности проводят посевы на короткий «цветной ряд» (среды Гисса) при этом сальмонеллы ферментируют глюкозу и маннит с образованием кислоты и газа, не расщепляют лактозу и сахарозу.

Дальнейшее изучение для установления видовой принадлежности проводят путем посевов на длинный «цветной ряд», в состав которого входят углеводы, и другие тесты.

Сальмонеллы не разжижают желатин, образуют сероводород, не образуют индол; дают положительную реакцию с метиловым красным: среда окрашивается в розово-красный цвет, отрицательную реакцию Фогеса-Проскауэра – желтое окрашивание среды.



Факторы патогенности

Вид *S. enterica* считают факультативным внутриклеточным паразитом, способным инвазировать нефагоцитирующие клетки эпителия слизистой оболочки кишечника и размножаться в макрофагах.

Адгезия - за счет имеющихся жгутиков сальмонеллы преодолевают слой слизи и быстро прикрепляются к стенкам кишечника.

Инвазия - сальмонеллы проникают в слизистую оболочку кишечника через М-клетки слизистой, в результате

инвазии М-клетки погибают, а бактерии инвазируются в собственную пластинку и лимфоидные образования кишечника, далее сальмонеллы проникают в брыжеечные лимфоузлы, грудной лимфатический проток и попадают кровоток.



Факторы патогенности

Бактериемия - в большинстве случаев проникновение сальмонелл в кровоток не вызывает клинических проявлений бактериемии, так как они быстро погибают под воздействием бактерицидных факторов сыворотки. Часть сальмонелл, избежавших гибели, при наличии иммунодефицитного состояния могут формироваться очаги воспаления.

Выработка токсинов - при гибели сальмонелл высвобождается значительное количество эндотоксина, что обуславливает неспецифические реакции макроорганизма: лихорадку, рвоту, боли в животе, неспецифическую активацию клеток иммунной системы в виде синтеза ими широкого спектра цитокинов и внутрисосудистое свертывание крови и т.д. Секретируются цитотоксины, ингибирующие секрецию ионов хлора, что приводит к избыточному выходу жидкости из клеток и развитию диареи. В развитии воспалительной реакции существенно значение имеет липополисахарид (ЛПС), высвобождающийся после гибели бактерий, меньшее значение в развитии диарейного синдрома играет способность к образованию термостабильного энтеротоксина, поражающая способность которого реализуется через повышение уровня цАМФ с нарушением секреции ионов натрия и хлора.

Эпидемиология

Брюшной тиф и паратифы

являются антропонозами,

то есть вызывают

заболевание только у человека.

Источником инфекции служит
больной или бактерионоситель,



Возбудители этих инфекций, как и другие сальмонеллы, устойчивы во внешней среде, сохраняются в почве, воде. *S. Typhi* может переходить в некультивируемую форму. Благоприятной для их размножения средой считают пищевые продукты (молоко, сметану, творог, мясной фарш, студень). Передача возбудителя осуществляется водным путем, играющим в настоящее время существенную роль, а также алиментарным и контактно-бытовым путями.



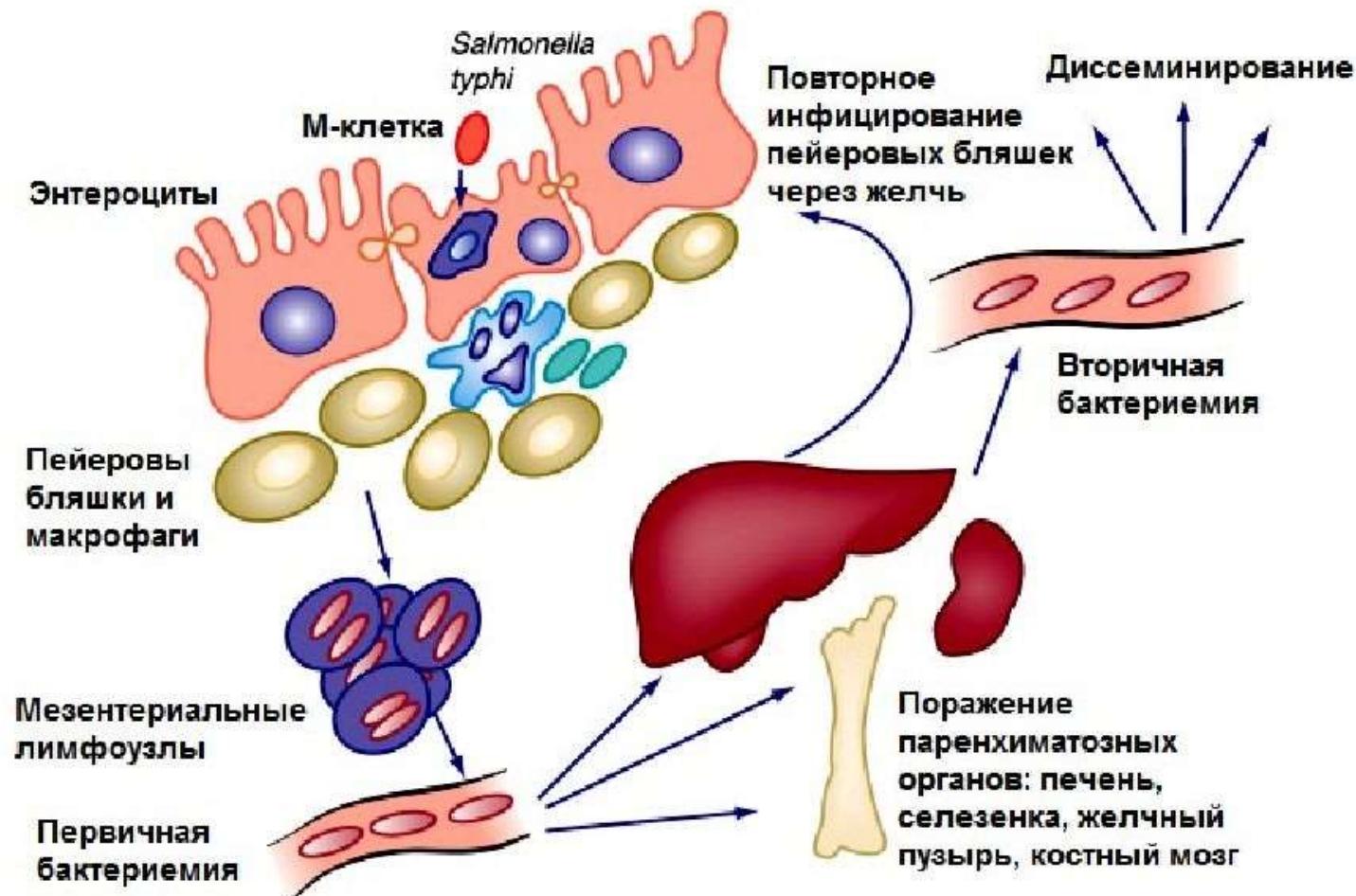
Патогенез

В зависимости от источника инфекции, путей передачи, особенностей патогенеза и форм проявления инфекционного процесса среди заболеваний, вызываемых сальмонеллами, различают системные инфекции (брюшной тиф и паратифы), сальмонеллезные гастроэнтериты и госпитальный (нозокомиальный) сальмонеллез. Различную природу заболевания объясняют

множественностью факторов патогенности (эндо-, экзотоксины и др.), которые еще недостаточно изучены. Все вирулентные сальмонеллы продуцируют эндотоксин, индуцирующий развитие лихорадки у инфицированных людей (с повышением температуры до 39-40°). После перорального заражения, попав в тонкий кишечник, сальмонеллы инвазируют слизистую кишечника и, размножаясь в макрофагах, формируют первичный очаг инфекции. По окончании инкубационного периода (через 10-14 суток после заражения) попав в кровь, сальмонеллы вызывают бактериемию. Возбудители тифа и паратифа с током крови разносятся по всему организму, оседая в клетках печени, селезенки, легких, костного мозга, а также желчного пузыря. К концу 2-й недели от начала заболевания возбудитель выделяется из организма больного с мочой, испражнениями, материнским молоком, слюной. Иммунитет к заболеванию не формируется



Патогенез брюшного тифа





Лабораторная диагностика брюшного тифа

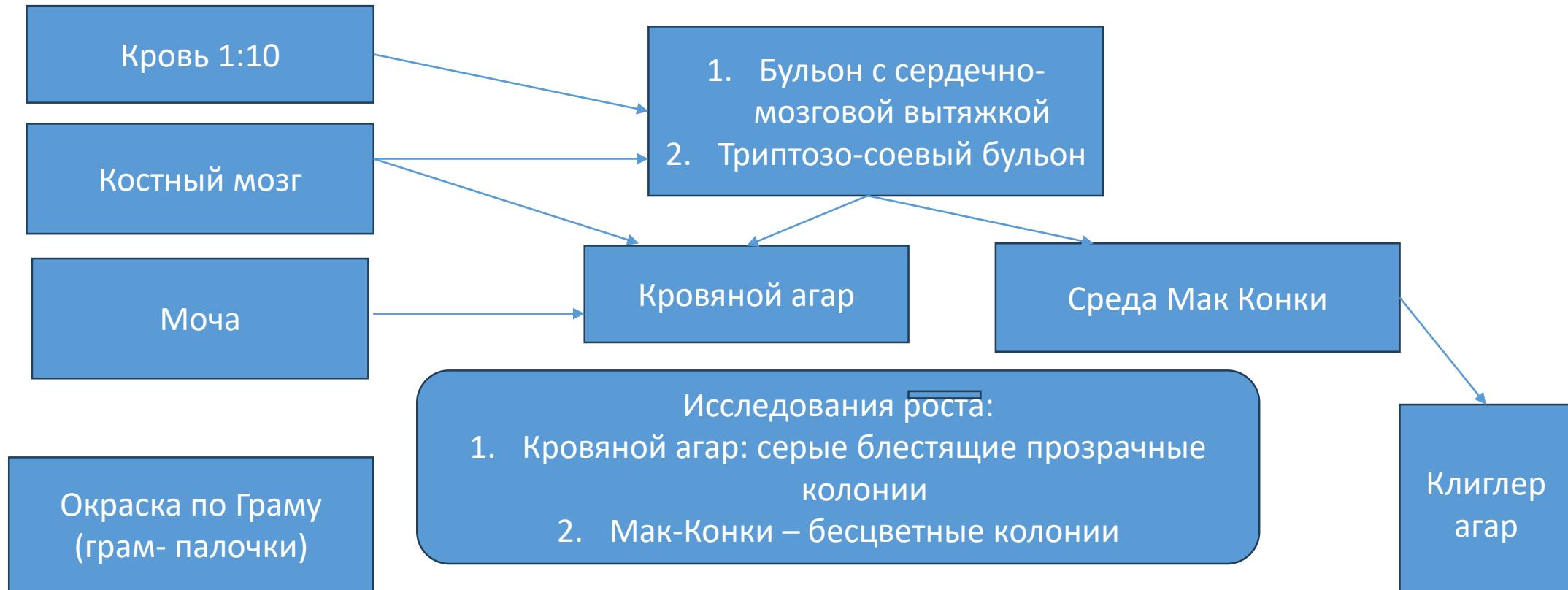
Неделя заболевания	Материал	Метод исследования
1-я неделя	кровь	Бактериологический (гемокультура)
2-я неделя	А) Испражнения, моча Б) сыворотка	Бактериологический (копрокультура, уринокультура) Серологические методы
Конец 2-ой недели		
3-я неделя	А) Испражнения, моча Б) сыворотка	Бактериологический (копрокультура, уринокультура) Серологические методы



Диагностика брюшного тифа и паратифов

- Материал для исследования:
- 1 неделя – кровь (гемокультура)
- с конца 2 недели – моча (уринокультура)
- С конца 2-3 недели – испражнения (копрокультура)
- Начиная со 2 недели и в течение всего периода заболевания – желчь

Материал, не содержащий постороннюю микробиоту





Материал, содержащий постороннюю микробиоту

- Висмут-сульфитный агар – черные, округлые, с черной или коричневой зоной 1-3 мм
- SS агар (сальмонелла- шигелла) – бесцветные 1-2 мм
- Гектоеновый агар – сине-зеленые без черного центра или желтые с черным центром
- Ксилозолизин дезоксихалатный агар (XLD) – красные с или без черного центра или желтые с черным центром 1-2 мм



Идентификация

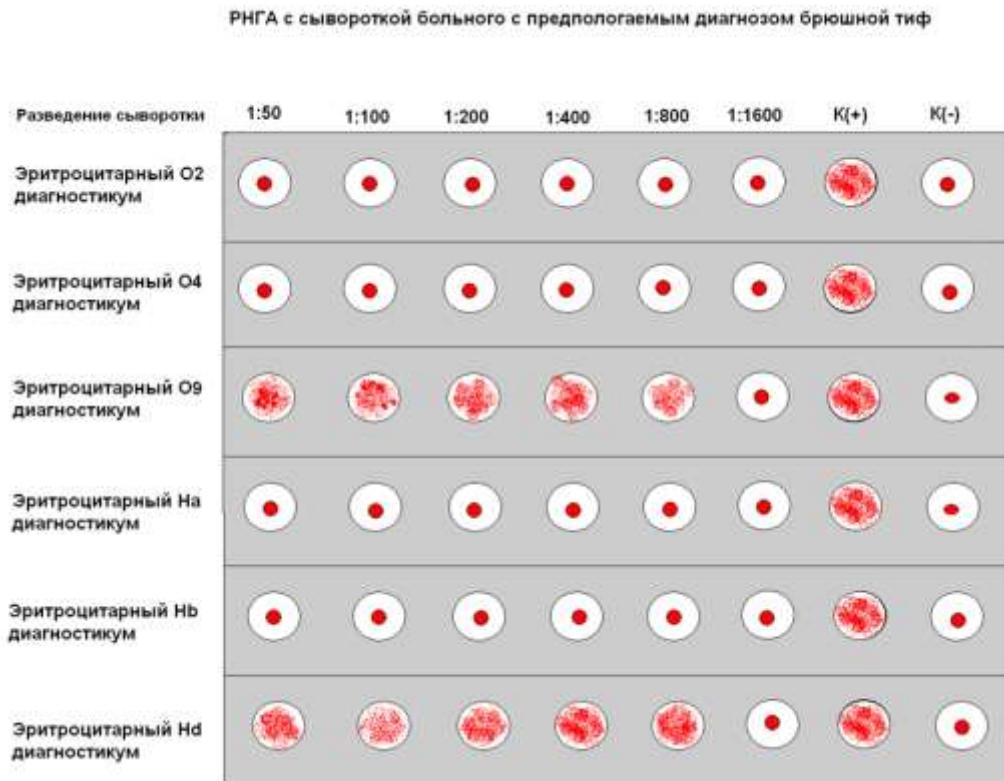
- Со среды Клиглера :
- Определение биохимических свойств (уреаза-)
- Определение подвижности
- Реакция агглютинации с поливалентными сальмонеллезными сыворотками, монорецепторными O сыворотками (определение серогруппы), монорецепторными Н сыворотками (определение серовара)
- Реакция агглютинации с Vi-сывороткой (*S.Typhi*)
- Определение чувствительности к антибиотикам на агаре Мюллера -Хинтона



Серологическая диагностика

- К концу 1 недели появляются антитела к О-антигену, достигают максимума к разгару заболевания, потом исчезают
- Антитела к Н -антигену появляются в период реконвалесценции, а также у привитых лиц и сохраняются длительно
- Антитела к Vi- антигену обнаруживаются у бактерионосителей

Серодиагностика брюшного тифа и паратифов



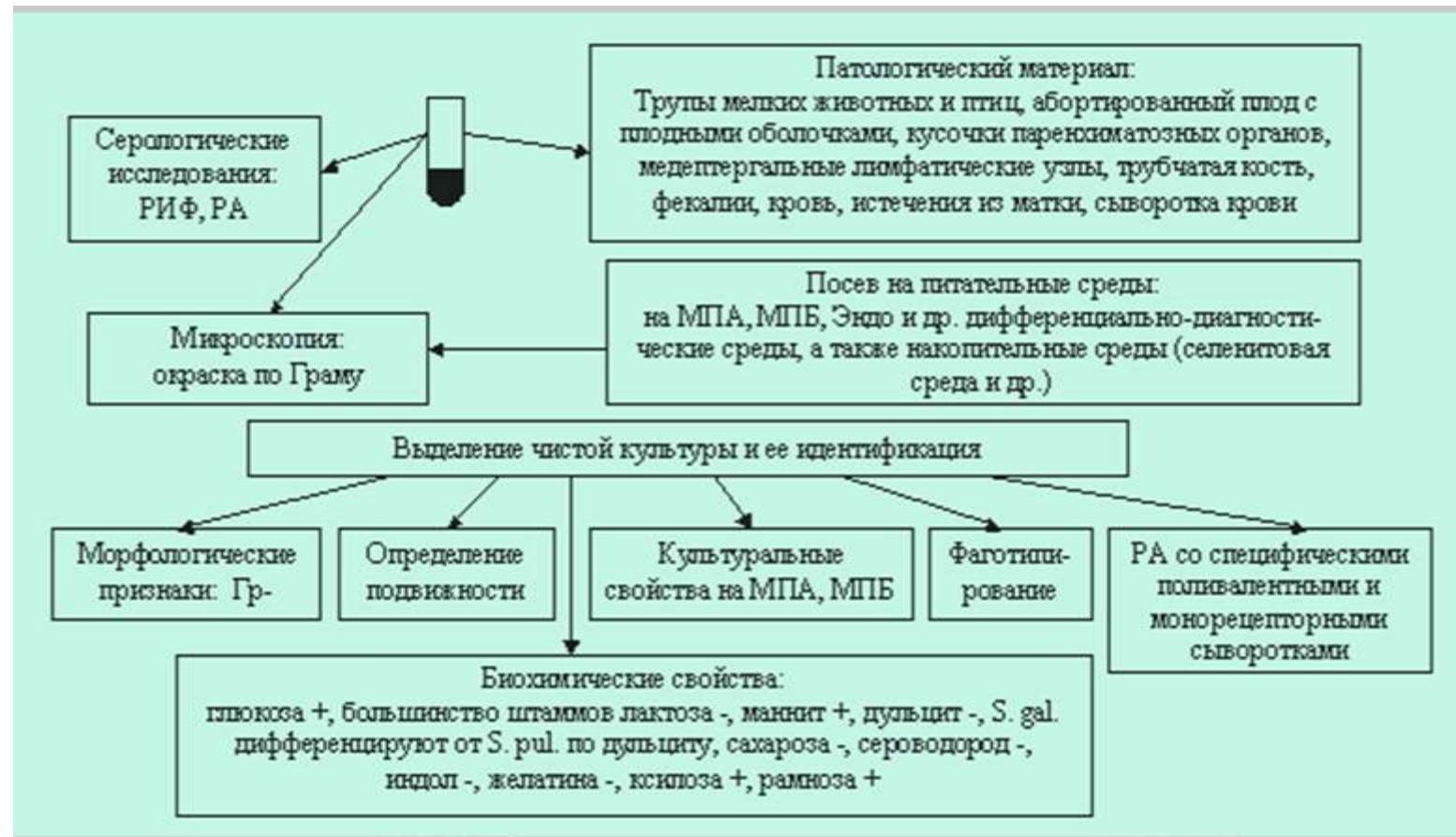
Лабораторная диагностика Серологические методы

РНГА с Н-, О- и Vi-антителом почти полностью вытеснила реакцию Видаля.

Исследование проводят при поступлении и через 7–10 сут.

- Диагностическое значение имеет нарастание титра О-антител в четыре раза или титр 1:200 и выше.
- Положительная реакция с Н-антителом свидетельствует о перенесённом ранее заболевании или вакцинации,
- с Vi-антителом — о хроническом брюшнотифозном носительстве.

Схема диагностики сальмонеллезов





Молекулярно-генетические исследования

- При работе с пищевыми продуктами обнаружение ДНК возбудителя требует дополнительного микробиологического исследования для выделения культуры возбудителя
- При работе с клиническим материалом обнаружение ДНК сальмонелл может использоваться в качестве скринингового теста при групповой заболеваемости и у пациентов с антибактериальной терапией, начатой до первичного лабораторного исследования

ИЕРСИНИИ

Возбудитель иерсиниоза - *Yersinia enterocolitica* относится к роду *Yersinia* семейства *Yersiniaceae*. Помимо *Y. enterocolitica* в этот род входят *Y. pestis* - возбудитель чумы, *Y. pseudotuberculosis* - возбудитель псевдотуберкулеза.

Возбудитель полиморфен: он может иметь форму либо палочки с закругленными концами, либо оvoidную с биполярным окрашиванием. Спор не имеет, иногда образует капсулу. Перитрих. Некоторые штаммы имеют пили. Грамотрицателен.



Виды иерсиний

- *Yersinia aldovae* BERCOVIER ET AL. 1984
- *Yersinia aleksiciae* SPRAGUE AND NEUBAUER 2005
- *Yersinia alsatica* LE GUERN ET AL. 2020
- *Yersinia artesiana* LE GUERN ET AL. 2020
- *Yersinia bercovieri* WAUTERS ET AL. 1988*
- *Yersinia canariae* NGUYEN ET AL. 2020*
- *Yersinia enterocolitica* (SCHLEIFSTEIN AND COLEMAN 1939) FREDERIKSEN 1964
- *Yersinia entomophaga* HURST ET AL. 2011
- *Yersinia frederiksenii* URSING ET AL. 1981*
- *Yersinia hibernica* NGUYEN ET AL. 2019
- *Yersinia intermedia* BRENNER ET AL. 1981*
- *Yersinia kristensenii* BERCOVIER ET AL. 1981*
- Отмечены иные виды, обладающие патогенным потенциалом для человека
- *Yersinia massiliensis* MERHEJ ET AL. 2008
- *Yersinia mollaretii* WAUTERS ET AL. 1988*
- *Yersinia nurmii* MURROS-KONTIAINEN ET AL. 2011
- *Yersinia pekkamenii* MURROS-KONTIAINEN ET AL. 2011
- *Yersinia pestis* (LEHMANN AND NEUMANN 1896) VAN LOGHEM 1944 *typus* – чумная палочка
- *Yersinia proxima* LE GUERN ET AL. 2020
- *Yersinia pseudotuberculosis* (PFEIFFER 1889) SMITH AND THAL 1965 – возбудитель псевдотуберкулёза
- *Yersinia rochesterensis* (CUNNINGHAM ET AL. 2019) NGUYEN ET AL. 2021
- *Yersinia rohdei* ALEKSIC ET AL. 1987*
- *Yersinia ruckeri* EWING ET AL. 1978*
- *Yersinia similis* SPRAGUE ET AL. 2008
- *Yersinia thracica* LE GUERN ET AL. 2020
- *Yersinia vastinensis* LE GUERN ET AL. 2020
- *Yersinia wautersii* SAVIN ET AL. 2014



Культуральные свойства иерсиний

Y. enterocolitica - палочки с закругленными концами, не окраивающиеся по Граму, но хорошо окраивающиеся другими красителями. Размеры палочек варьируют от 0,8 до 1,2 мкм в длину и от 0,5 до 0,8 мкм в ширину. Выращенные при температуре 37 °C микробы бывают очень мелкими ("коккобактерии"). Бактерии обладают подвижностью за счет жгутиков, расположенных перитрихиально. Число жгутиков и их локализация варьируют.

Подвижность выявляется при культивировании при 18 - 20 °C. При 37 °C микробы всегда неподвижны. Микроб не образует спор и капсулы. Оптимальной для роста является рН среды 7,2 - 7,4, но бактерии могут размножаться как в слабокислой (рН 6,6 - 6,8), так и слабощелочной среде (рН до 8,0). Наиболее благоприятна для роста *Y. enterocolitica* температура 22 - 25 °C. Растут они и при более высокой температуре 28 - 37 °C, но часто в переходных или шероховатых формах. При температуре 42 °C и выше рост прекращается. Хорошо растут при 18 - 14 °C, медленнее - при +4 °C. Возбудители иерсиниоза - аэробы, могут выживать при сниженному содержании кислорода. Бактерии лучше растут на менее плотных средах (1,5 - 1,4% содержания агара). *Y. enterocolitica* неприхотливы, нетребовательны и растут на обычных питательных средах (МПА, агары Хоттингера и Мартена). Несколько хуже растут на средах Эндо, Лёвина (ЭМС), Плоскирева.



Gram-negative *Yersinia pseudotuberculosis* bacteria, cultured on a Hektoen enteric agar (HEK) medium 48hrs



Gram-negative *Yersinia pseudotuberculosis* bacteria, cultured on SBA 24hrs (10x mag).

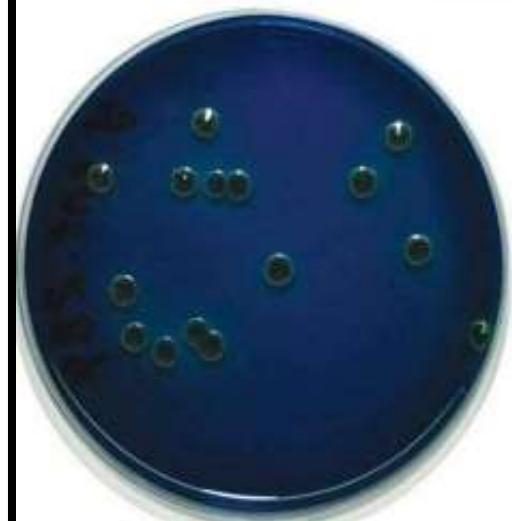


Gram-negative *Yersinia pseudotuberculosis* bacteria, cultured on a MacConkey agar (MAC)



Gram-negative *Yersinia pseudotuberculosis* bacteria, cultured on chocolate agar medium

Среда СБТС



Yersinia enterocolitica



Yersinia pseudotuberculosis

На среде Эндо





Характеристика колоний *иерсиний* на плотных питательных средах

Вид	Среда Эндо		Среда Хоттингера		СБТС (среда с желчью и бромтиловым синим)		Примечание
	24 часа	48 часов	24 часа	48 часов	24 часа	48 часов	
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	Колонии мелкие (росинчатые) круглые, выпуклые, блестящие, бесцветные	Колонии диаметром 0,1-0,2 мм, крупные, выпуклые, блестящие с ровными краями, бесцветные	Колонии диаметром 0,1-0,2 мм, голубовато-белые полупрозрачные с ровными краями, слизистые со слабоприподнятым центром (под микроскопом имеют вид пирамид или со сходящимися к центру гранями)	Колонии диаметром 0,2-0,5 мм, прозрачные с ровным краем. В полиморфной популяции – часть колоний бугристая с неровными фестончатыми краями	Колонии мелкие круглые, могут иметь слегка желтоватую окраску	Колонии диаметром 1 – 2 мм, голубовато-зеленоватые, с фестончатыми краями, выпуклые с приподнятым центром и суховатой матовой поверхностью на синем фоне среды	На СБТС через 48 ч колонии <i>E. coli</i> – ярко-желтые, диаметром 2-3 мм, сочные, выпуклые; <i>Sh. flexneri</i> – желтые, диаметром 1-2 мм сочные, плоские
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Такие же	Такие же, но с розоватым оттенком	Колонии диаметром 0,1-0,2 мм до 0,5 мм, круглые, выпуклые с ровным краем, полупрозрачные с голубоватым оттенком мягкой консистенции	Колонии диаметром 0,3-0,5 мм более выпуклые, с ровным краем, прозрачные		Колонии диаметром 2 – 4 мм, голубовато-зеленоватые, выпуклые, сухие, с матовым налетом	



Биохимические свойства *иерсиний*

Микроб обладает уреазной активностью, которая при культивировании при 22 - 25 °C выявляется чаще на вторые сутки. Часть штаммов выделяет индол. *J. enterocolitica* продуцирует сероводород и аммиак, положительно реагирует в пробе с метиловым красным, восстанавливает нитраты в нитриты. Проба Фогеса - Проскауэра положительна при температуре 18 - 22 °C и отрицательна при температуре 37 °C. *J. enterocolitica* не обладает протеолитической, плазмокоагулирующей и фибринолитической активностью. Микроб не утилизирует малонат натрия при температуре 18, 28 и 37 °C, не обладает орнитиндекарбоксилазой, оксидазой, фенилаланиндиназой, продуцирует каталазу, -галактодидазу. Активно ферментирует до кислоты без газа многие спирты и сахара (табл. 1). Иногда могут выделяться штаммы, продуцирующие очень небольшое количество газа (пузырек в поплавке не более 1 мм в диаметре). Это свойство чаще регистрируется у *J. enterocolitica* 09 серовара.



Антигенная структура

J.

<i>Y. pseudotuberculosis</i>	<i>Y. enterocolitica</i>
<p>21 серотип Наибольшее значение в патологии человека имеют серотипы:</p> <p>O:1a, O:1b, O:1c O:3 O:4a, O:4b O:5a, O:5b</p>	<p>31 серотип Наибольшее значение в патологии человека имеют серотипы:</p> <p>O:3 O:4 O:5 O:8 O:9 O:13 O:18 O:20 O:21</p>



Факторы патогенности

Под действием токсинов усиливается перистальтика кишечника и возникает диарея. Иногда в патологический процесс вовлекается аппендикс, развивается аппендицит. Незавершенный фагоцитоз способствует генерализации процесса. У людей со сниженным иммунитетом могут развиться сепсис с образованием вторичных гнойных очагов в мозге, печени и селезенке.

К важнейшим патогенным свойствам относят: адгезивность и колонизацию, внутриклеточное размножение (в эпителиальных клетках, макрофагах), цитотоксичность и способность вызывать генерализованный инфекционный процесс,

энтеротоксигенность, выраженную у большинства штаммов, а также инвазивность, установленную у штаммов патогенных сероваров..



Эпидемиология и патогенез

Иерсиниоз - острое инфекционное заболевание людей и животных разных видов, включая птиц. Иерсиниозы широко распространены в мире. В ряде стран Европы кишечный иерсиниоз занимает третье место по заболеваемости среди кишечных инфекций, после кампилобактериоза и сальмонеллеза. Источники болезни для человека - крысы, мыши, животные и птицы. Механизм заражения иерсиниозом фекально-оральный, основным путем передачи является алиментарный: болезнь может возникнуть при употреблении фруктов, овощей, молока, мяса. Но возможны также контактный (при контакте людей с больными животными) и водный пути передачи. При кишечной форме возбудитель болезни локализуется в желудочно-кишечном тракте и мезентериальных лимфатических узлах; при септической - еще и в паренхиматозных органах, крови, костном и головном мозге и регионарных лимфатических узлах.

Как *Y. enterocolitica*, так и *Y. pseudotuberculosis* сохраняют жизнеспособность в условиях пониженных температур. Случаи передачи инфекции от человека к человеку или при переливании инфицированной крови описаны, но очень редки.



Материал для исследования

- испражнения на протяжении всего периода заболевания;
- мочу в первые семь дней болезни;
- мазки из зева в первые три дня болезни;
- кровь в течение болезни при фебрильной лихорадке, весь лихорадочный период и в период рецидива болезни;
- операционный или секционный материал (ткань аппендикулярных отростков, мезентериальные лимфоузлы, биоптаты синовиальной оболочки, синовиальная жидкость, биоптаты слизистой кишечника, другие патологически измененные органы и ткани), сгустки крови, желчь, содержимое кишечника.



Бактериологическое исследование

- Схема бактериологического исследования включает "холодовое обогащение" исследуемого материала при температуре 6+/-2°C, использование дифференциально-диагностических сред для выделения и идентификации штаммов, определение их серотипа, биотипа, маркеров патогенности. Также для индикации псевдотуберкулёзного микробы возможно использование метода флюоресцирующих антител (МФА) с применением иммуноглобулинов диагностических флюоресцирующих.
- Молекулярно-генетическое исследование проводится в день поступления материала. При получении отрицательного результата ПЦР-исследование повторяют на 3 календарный день после "холодового обогащения".



Серологический метод

- Для серологического исследования на иерсиниозы необходимо два образца сыворотки крови (ОСК), взятые в разные периоды заболевания (парные сыворотки): в первую неделю от начала заболевания и в конце второй - начале третьей недели болезни. Серологическая диагностика основывается на появлении или нарастании титра специфических антител в течение болезни.
- При исследовании ОСК в реакции непрямой гемагглютинации (РНГА) достоверным считается 4-кратное и выше нарастание титра антител при исследовании парных сывороток.
- Методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием существующих тест-систем выявляют антитела классов IgA, IgM, IgG к родоспецифическим белкам *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*.
- Для подтверждения диагноза при затяжном и хроническом течении иерсиниозов (более трех месяцев), а также в сложных диагностических случаях используют референс-метод иммуноблота.

Принципы диагностики инфекций, вызванных энтеробактериями

Идентификация энтеробактерий включает **три этапа**:

- а) первичную идентификацию
- б) установление рода (дифференциацию родов)
- в) идентификацию вида и внутривидовую дифференциацию.

Предварительный этап : накопление на жидких средах (желчный, селенитовый бульон)

1 этап: посев на дифференциальнодиагностические среды (Эндо, Левина, Плоскирева) на 24 часа при температуре 37 ° С.

2 этап: пересев подозрительных колоний на среду Клиглера

Отбор подозрительных колоний:



лактозоположительные (патогенные
эшерихии?)
и
лактозоотрицательные (сальмонеллы,
шигеллы, энтоинвазивные эшерихии?)

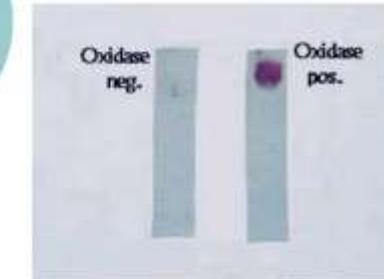
Микроскопия мазка. Ставят оксидазный тест и реакцию агглютинации на стекле с поливалентными ОК сыворотками.



- Бактерии семейства Enterobacteriaceae
- Все энтеробактерии - мелкие палочки, в мазке располагаются беспорядочно.
- По Граму окрашиваются отрицательно: в красный цвет



Oxidase Test



Oxidase (+) *Pseudomonas*



Oxidase (-) *E.coli, Proteus*

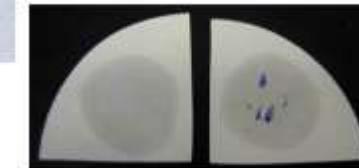


Рис. 35. Реакция агглютинации на предметном стекле.
а — агглютинация; б — отсутствие агглютинации.

Ферментации лактозы (и сахарозы) в среде Олькеницкого и ферментации лактозы в среде Клиглера судят по появлению желтой окраски в скошенной части агара, а о ферментации глюкозы - по такому же окрашиванию в столбике. Газообразование устанавливают по появлению пузырьков, разрывам агара или его отслоению от стенок пробирки. Образование сероводорода устанавливают по почернению среды обычно в средней части столбика, при значительной продукции можно наблюдать почернение всей среды.



3 этап: идентификация культуры по антигенным и биохимическим свойствам

Постановка развернутой реакции агглютинации с моновалентными сыворотками

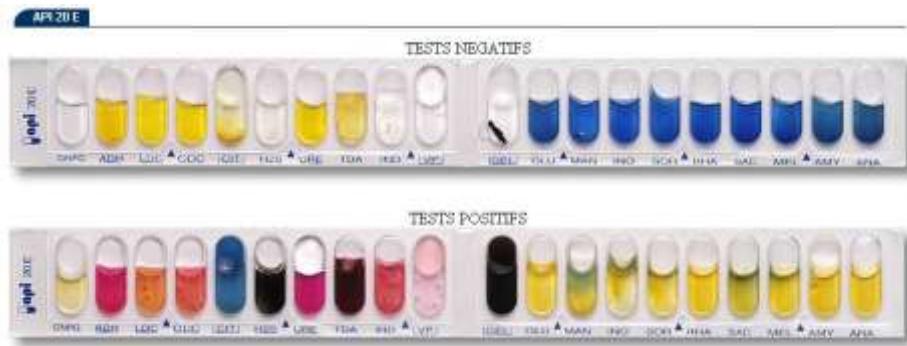


Таблица 15.3. Классификация сальмонелл по антигенней структуре по Клауфману-Уайту

Серовар	Серогруппа	Антиген		
		О	Н	
			фаза I	фаза II
S. Paratyphi A	2 (A)	1, 2, 12	<i>a</i>	—
S. Derby	4 (B)	1, 4, 5, 12	<i>f, g</i>	1, 2
		1, 4, 5, 12	Z10	1, 2
		1, 4, 5, 12	<i>b</i>	1, 2
		1, 4, 5, 12	<i>i</i>	1, 2
S. Infantis	6, 7 (C1)	6, 7	<i>R</i>	1, 5
S. Choleraesuis		6, 7	<i>c</i>	1, 5
S. Paratyphi C		6, 7 (vi)	<i>c</i>	1, 5
S. Newport	6, 8 (C2)	6, 8	<i>eh</i>	1, 2
S. Duhlin	9 (D1)	1, 9, 12 (vi)	<i>g, p</i>	—
		1, 9, 12	<i>a</i>	1, 5
		1, 9, 12	<i>g, m</i>	—
		1, 9, 12	<i>e, v</i>	1, 5
S. Typhi		9, 12 (vi)	<i>d</i>	—
S. Anatum	3 (E1)	3, 10	<i>c, h</i>	1, 6

Биохимическую активность определяют с помощью стандартных наборов либо производят исследования на минимальном дифференцирующем ряду

ИДЕНТИФИКАЦИЯ API ТЕСТЫ



В лунки вносится суспензия чистой культуры микроорганизма, приготовленная на основе физиологического раствора, дистиллированной воды и/или питательной среды (в зависимости от исследуемого микроорганизма). Здесь происходит растворение субстратов. Далее стрип инкубируют в соответствующих условиях и через 18—24 ч (2 или 4-4,5 ч для «быстрых» стрипов) учитывают результат. Учет результата происходит по изменению цвета среды.

Для серологической диагностики коли-энтеритов начиная с третьего-пятого дня заболевания применяют **реакцию непрямой гемагглютинации**. Положительным ответом считают нарастание титра антител в динамике заболевания.

Постановка и учет РНГА.

Реакция положительна, если образуется фестончатый осадок ("кружевной зонтик").

Реакция отрицательна при образовании осадка в виде пуговки.





Экспресс - методы

- Молекулярно-генетический
- ИХА
- Латекс-агглютинация





Нормативно-методические документы

- СанПиН 3.3686-21 "Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней"XXIV. Профилактика острых кишечных инфекций
- МУ 4.2.4070-24 «Лабораторная диагностика сальмонеллезов, обнаружение сальмонелл в пищевых продуктах и объектах окружающей среды»
- МР 4.2.0249-21 "Серологическая диагностика острых кишечных инфекций методом РПГА (шигеллеза, сальмонеллеза и брюшного тифа)
- МУК 4.2.2963-11 Методические указания по лабораторной диагностике заболеваний, вызываемых , производящих шига-токсины (STEC-культуры), и обнаружению возбудителей STEC-инфекций в пищевых продуктах
-



Нормативно-методические документы

- МУК 4.2.3019-12 «Организация и проведение лабораторных исследований на иерсиниозы на территориальном, региональном и федеральном уровнях»
- МУ Методические указания МУ 3.1.1.2438-09 "Эпидемиологический надзор и профилактика псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза»
- Методические указания МУК 4.2.3963-23 "Бактериологические методы исследования воды« (определение бактерий: *E.coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Y.enterocolitica*)



Благодарю
за внимание!