

FAMILIA ENTEROBACTERIACEAE.

MICROBIOLOGIA SI DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL ESCHERICHIOZELOR ŞI AL DIZENTERIEI BACTERIENE



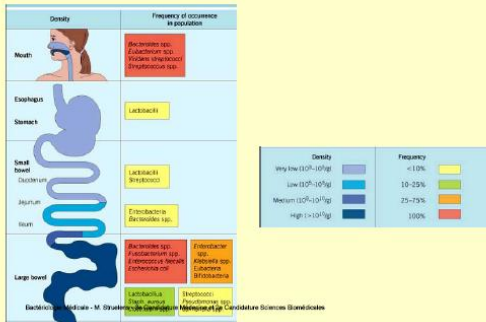
FAMILIA ENTEROBACTERIACEAE



- Peste 30 genuri cu peste 150 specii
- Habitat: intestinul gros al omului, animalelor. Pot fi intalnite pe sol, plante, in apa, etc
- Martori de contaminare fecală a mediului
- Majoritatea fac parte din microflora normală (comensală) intestinală

98 sur 310

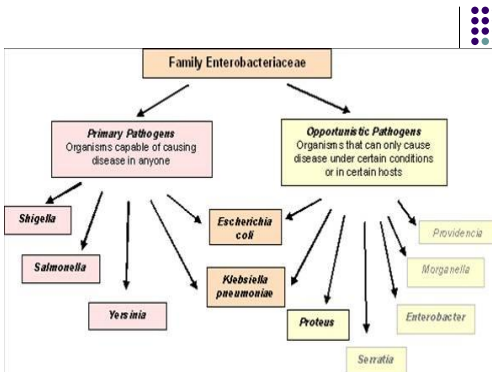
Flore gastro-intestinale



CLASIFICAREA



- ÎN FUNCȚIE DE PATOGENITATE:
 - **Enterobacterii patogene:** genurile *Shigella*, *Salmonella*, *Yersinia*, unele variante ale genului *Escherichia*;
 - **Enterobacterii condiționat patogene:** genurile *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Proteus*, *Providencia*, *Serratia*, *Edwardsiella*, etc.



- în 11 luni ale anului 2009 s-au înregistrat 16627 cazuri de boli diareice acute (BDA), inclusiv 12580 cazuri la copii în vîrstă pînă la 17 ani, comparativ cu 15207 cazuri, inclusiv 11315 cazuri la copii în vîrstă pînă la 17 ani în aceeași perioada ale anului 2008. Ponderea copiilor din numărul total al bolnavilor depistați cu BDA în 11 luni ale anului 2009 constituie 76,0 %.
- În primele 2 luni ale anului 2010 s-au înregistrat 2265 cazuri de BDA, inclusiv 1831 cazuri la copii în vîrstă pînă la 17 ani, comparativ cu 2226 cazuri, inclusiv 1811 cazuri la copii în vîrstă pînă la 17 ani în primele 2 luni ale anului 2009.

TESTE-CHEIE ALE FAMILIEI ENTEROBACTERIACEAE

- Bacterii (bastonașe) gramnegative
- Nesporogene
- Mobile-peritriche sau imobile
- Facultativ-anaerobe
- Fermentează glucoza pînă la acid (A) sau acid și gaz (AG)
- Catalazo-pozitive
- Oxidazo-negative
- Reduc nitrații în nitriți



TESTE PRIMARE (Identificarea genurilor)

- Utilizarea citratului de Na (mediul Simmons)
- Utilizarea malonatului de Na
- Hidroliza ureei (testul Preus)
- Decarboxilarea lizinei (LDC)
- Dezaminarea fenilalaninei (FAD)
- Producere de H₂S în mediul multitest (ex.: Kligler)
- Fermentarea glucozei pînă la acizi (testul MR)
- Fermentarea glucozei pînă la acetoină (testul VP)
- Mobilitatea (în geloză semilichidă)



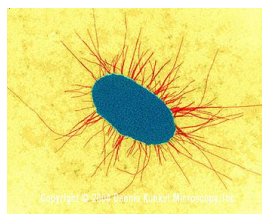
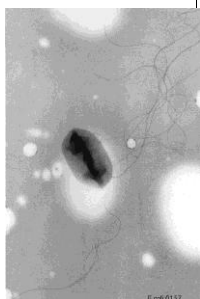
TESTE SECUNDARE (Identificarea speciilor/varietatelor)

- Teste biochimice (fermentarea glucidelor, decarboxilarea aminoacizilor (arginină, ornitină), producerea indolului, etc)
- Fagoidentificarea și lizotipia
- Colicinogenotipia
- Seroidentificarea
- Antibiotograma



CARACTERE MORFOBIOLOGICE

- **Caractere morfologice:** bastonașe G-, 1 - 6 μm x 0,3 - 1 μm, mobile peritriche (*Shigella*, *Klebsiella*, *Yersinia pestis* – imobile), nesporogene, formează microcapsule (*Klebsiella* – capsulată), posedă fimbrii.



- **Caractere de cultură:**

- Anaerobe facultativ
- Temperatura optimă 37 grade C (limite – 18 – 45 grade)
- Nepretențioase nutritiv
- Colonii S, apar după 18-24 h de incubare, 2 - 3 mm (după repicări pot apare colonii R), *Klebsiella* – colonii M (mucoide), *Proteus* – invadează suprafața mediului

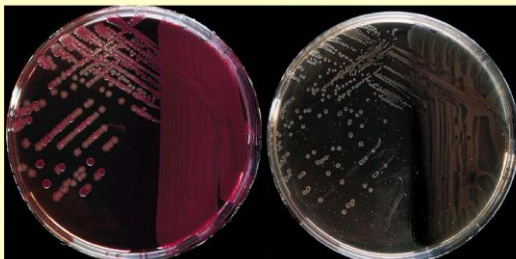


MEDII DE CULTURĂ

- **De transport:** glicerină 30%, soluție salină 3%, soluție tampon-fosfat
 - **De îmbogățire** a bacteriilor patogene: Kauffmann, Muller, bulion selenit, etc
 - **Diferențial-diagnostice:**
 - 1. **De izolare a culturii pure**
 - ENDO, LEVIN, PLOSKIREV
- Compoziția: bază nutritivă, lactoză, indicator
- Colonii L+ : colorate; Colonii L- : incolore (frecvent flora patogenă)
- Mediul Wilson-Blair cu sulfid de Bi (*Salmonella* reduce sulfitul în sulfură de Bi – colonii negre pe mediul verde)



112 sur 310

*E.coli**Salm. Typhi*

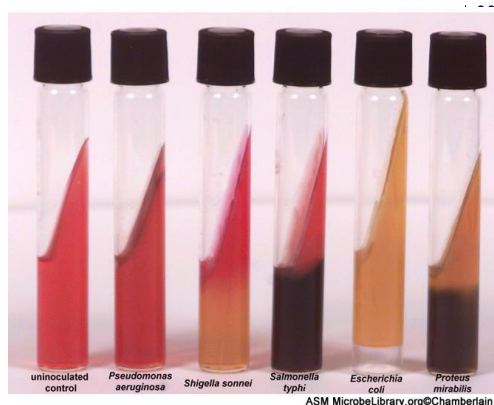
Bactériologie Médicale - M. Struelens - Je Candidature Médecine et Je Candidature Sciences Biomédicales



II. De acumulare și identificare preliminară (medii multitest)

- Russel, Kligler (glucoză, lactoză, săruri de Fe, indicator)
- Olkenițki (glucoză, lactoză, zaharoză, uree, săruri de Fe, indicator)

III. De identificare finală (medii cu citrat, malonat, șirul Hiss, medii cu aminoacizi, gelatina, etc)



CARACTERE ANTIGENICE

- **Ag O**, de perete, LPZ, termostabil și rezistent la alcool, sensibil la formol, specificitate de gen, specie, grup. Stimulează producerea Ig M.
- **Ag H**, flagelar, proteic, termolabil și inactivat de alcool, rezistent la formol, specificitate de tip (variantă). Stimulează producerea Ig G.
- **Ag K**, superficial, capsular, termovariabil, specificitate de specie, tip. Maschează Ag O, inaglutinabilitate cu seruri anti-O. Variante – L, A, B la *E.coli*, Vi – la *Salmonella* și *Citrobacter*
- **Ag F**, fimbrial, termolabil, nespecific
- **ECA** – (Enterobacterial Common Antigen) antigen comun fam. Enterobacteriaceae (interes taxonomic) – **Ag Kunln**

104 sur 310

Entérobactéries : Antigènes O, K, H

Structure	Designation	Composition
Flagellum	H	Protein subunits
Fimbriae (pili)	Sex, Type I, P, etc.	Protein subunits
Capsule or microcapsule	K (A, L, B, Vi)	Polysaccharides (rarely proteins)
Outer membrane	Endotoxin (LPS, OAg)	Protein, phospholipids, lipopeptide, lipid A, and O ⁺ antigen side chains of lipopolysaccharide
Thin rigid layer	Peptidoglycan	Crosslinked peptidoglycan bound to outer membrane
Periplasmic space		Area of synthesis, assembly of substances
Inner membrane		Protein, phospholipids
Dytoplasm		Cell wall, DNA, RNA, ribosomes

MAJOR STRUCTURAL CELL WALL COMPONENTS OF ENTEROBACTERIAECIAE
 Layer of capsule
 Capsule (in a cell envelope)
 Outer membrane
 Lipopolysaccharide (LPS)
 Peptidoglycan layer
 Periplasmic space
 Inner membrane
 Dytoplasm

Bacteriologie Médicale - M. Struelens - De Centrale Laboratorium et De Centrale Sciences Biomedicales

Genul *Escherichia*.

Diagnosticul de laborator al escherichiozelor

- Genul *Escherichia*
- Spp.: *E.coli*, *E.blattae*, *E.fergusonii*, *E.vulneris*, *E.hermanii*
- *E.coli* descoperita in 1885 de Theodor Escherich, pediatru si bacteriolog

Habitat: intestinul gros al omului și animalelor (80% din flora aerobă intestinală), 10⁷-10⁹ bacterii/gram fecale.

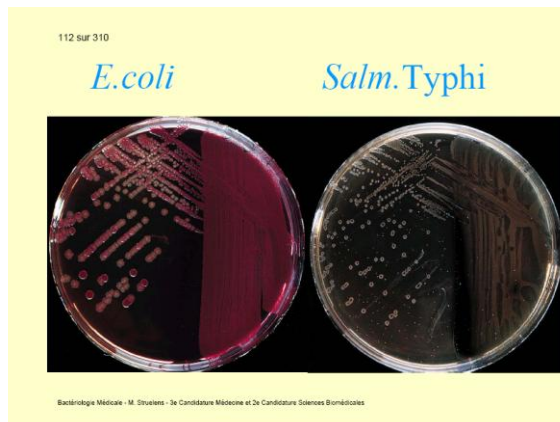
Contaminează solul și apele de suprafață. Prezența *E.coli* - indicator de contaminare fecală

• Rolul *E.coli* în fiziologia umană

1. Manifestă activitate antagonică față de alte bacterii, inclusiv cele patogene (probiotic – tulpina Nissle 1917)
2. Stimulează dezvoltarea țesutului limfoid prin intermediul Ag sale
3. Participă la procesele de digestie, inclusiv în metabolismul colesterolului și acizilor biliari
4. Asigură organismul cu vitamine, sintetizând vitamine B, K, acid nicotinic, acid folic, etc.

CARACTERE MORFOBIOLOGICE

- *E.coli* – enterobacterie tipică, mobilă, lactoză+ (colonii colorate pe medii DD de izolare), fermentează glucoza cu formare de AG, teste primare: MR +, mobilitate +, LDC+, celelalte teste sunt negative
 - **Structura antigenică**
 - Ag O – 180 tipuri (O1, O2, O3,.....O180)
 - Ag H – 60 tipuri (H1, H2, etc)
 - Ag K – 100 tipuri
- Din combinații rezultă serovariante:
ex.: O55:H2:K1



FACTORI DE PATOGENITATE

- Capsula (antifagocitar, Ag K1 – camuflaj imunologic datorită epitopilor comuni cu polisialozil-glicopeptide cerebrale la nou-născuți)
- Proteine din ME și LPZ (anti-complement, protecție de factorii bactericizi ai sângelui, adeziune, invazie)
- Fimbrii: pili manozo-sensibili/rezistenți, pili CFA, pili P (adeziune la mucoasa intestinală și alte substrate)
- Toxine (endotoxina, enterotoxine termostabile - ST și termolabile – LT (codificate plasmidic), citotoxine – “Shiga-like” toxine (SLT-1, SLT-2), codificate bacteriofag
- Hemolizina
- Siderofori (sisteme de captare a Fe)



ROLUL *E. COLI* ÎN PATOLOGIA UMANĂ

• FENOTIPURI DIAREIGENE

- **Tulpini enteropatogene: EPEC** (O26, O55, O111, O125, O142, etc). Responsabile de gastroenterite infantile (**Infecții salmoneliforme**). Aderă la mucoasa intestinului subțire printr-o proteină din membrana externă fără a penetra intracelular, distrug microvilozitățile, perturbă procesele de secreție și absorbție intestinală.
- **Tulpini enteroinvazive: EIEC** (O28, O124, O143, etc). Responsabile de **sindrom dizenteric** (infecție dizenteriformă) cu invazia mucoasei colonului, penetrare intracelulară, ulceratii. Factori de patogenitate: adevine, citotoxine (SLT).



- **Tulpini enterotoxigene: ETEC** (O6, O8, O20, O25, O115, etc). Responsabile de “diareea călătorului”, **sindrom holeriform**. Adeziunea la enterocitele intestinului subțire este asigurată de pili (CFA “colonization factor antigen” sau CSF “coli surface factors”). Elaborează toxine – enterotoxine LT și/sau ST. Activează adenilat- respectiv guanilat ciclaza enterocitelor cu acumulare de AMPc sau GMPc intracelular, provocând o secreție sporită a ionilor de Cl⁻ și inhibiția absorbției ionilor de Na⁺, antrenând o pierdere hidrică importantă.



- **Tulpini enterohemoragice: EHEC** (O157:H7; O26, O111). Responsabile de colite hemoragice cu sindrom uremic-hemolitic (anemie hemolitică + trombocitopenie+insuficiență renală). Posedă factori de adeziune și produc citotoxine capabile de difuzie în organism (“Shiga-like” toxine – SLT 1 și SLT 2). Receptori specifici sunt pe enterocite, celulele endoteliale și celulele epitelului renal. Produc frecvent hemolizina.
- **Tulpini enteroagregative: EAaggEC** (O111:H12). Posedă adevine, hemolizine și ST. Provoacă diaree persistentă (peste 14 zile) la copii și adulți cu imunopresie (HIV/SIDA). Aderă agregativ la suprafața culturilor de celule.
- **Tulpini enteroadezive: EAEC**. Aderă difuz la celulele intestinale și culturile de celule. Provoacă sindroame diareice.



- **FENOTIPURI UROPATOGENE (01, 02, 04, 06)**
Posedă afinitate pentru mucoasa uro-genitală (fimbrii tipul 1 sau P, Ag O și K specifice, hemolizine, etc).

- **FENOTIPURI BACTERIEMICE**

- **Alte forme clinice provocate de *E.coli*:**

- Sepsis, șoc endotoxinic
- Meningite la nou-născuți (preponderent tulpini cu Ag K1)
- Infecții ale plăgilor (frecvent de origine nosocomială)
- Colecistite, peritonite, salpingite, etc.
- Toxiinfecții alimentare

- **Tratamentul** escherichiozelor

- **Antibiotice** – peniciline semisintetice, cefalosporine, aminoglicozide, carbapeneme, ciprofloxacina, trimetoprim, nitrofurane, aztreonam. Antibiograma obligatorie, rezistența multiplă
- **Eubiotice** (colibacterină, lactobacterină, bifidumbacterină, bificol, etc)
- **Bacteriofagi**
- **Profilaxia** escherichiozelor - nespecifică

CARACTERE MORFOBIOLOGICE

- Enterobacteriaceea tipice, imobile, lactozo-negative (colonii incolore pe medii DD), scindează glucoza până la acizi (testul MR+), celelalte teste primare sunt negative.

FACTORI DE PATOGENITATE:

- Factori de adeziune la mucoasa colonului (fimbrii, LPZ)
- Microcapsula (antifagocitar)
- Factori de penetrare și multiplicare intracelulară
- Toxine:
 1. Toxina Shiga, de origine cromosomală. Inhibă sinteza proteinelor în celula gazdă. Manifesta activitate neurotoxică, enterotoxică, citotoxică – elaborată de *S.dysenteriae* 1.
 2. Citotoxine (Shiga-like toxine (SLT), verotoxine), codificate de bacteriofagi. Efect similar cu cel al toxinei Shiga.
 3. Endotoxina

DIAGNOSTIC DE LABORATOR

- **Prelevate** în funcție de forma clinică: materii fecale, urină, sânge, LCR, puroi, etc
- **Metode de diagnostic**
 1. Examenul microscopic de orientare (frotiu Gram în infecții extra-intestinale, RIF)
 2. Examenul bacteriologic (de bază, cantitativ) – **detalii în Ghid !!!!!**
 3. Examenul serologic (retrospectiv, de confirmare) – RA cu autotulpini (titru diagnostic – 1:200)

GENUL SHIGELLA. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL DIZENTERIEI

- Shigelele – strict umane. Cauzează infecții intestinale - șigeloze, cea mai gravă formă – dizenteria bacteriană.
- Clasificarea genului **Shigella** (biochimic și antigenic):
 - A – *Shigella dysenteriae* (12 s/v, 12 b/v) **Manitol**
 - B – *Shigella flexneri* (6 s/v, 14 ss/v, 23 b/v)
 - C – *Shigella boydii* (23 s/v)
 - D – *Shigella sonnei* (1 s/v, 7 b/v)
- Subgrupele B, C, D – manitol +
- Descoperite în 1898 de Kiyoshi Shiga



Structura antigenică: Ag O și K cu specificitate de gen, specie, subspecie, variantă

Rezistența în mediul extern:

S.dysenteriae - foarte sensibilă (1-2 ore)

S.flexneri – persistă 1-3 săptămâni în apă, 2 luni în lactate

S.sonnei – persistă și se multiplică în lactate

PATOGENEZA DIZENTERIEI BACTERIENE

- **Sursa de infecție:** bolnav, reconvalescent, purtător
- **Transmiterea fecal-orală:**
 - Contact direct (mâini murdare)
 - Alimentar (alimente, apă)

Doza infectantă: $10-10^2$ bacterii

Bacteriile patrund în intestinul gros. Celulele epiteliale normale sunt rezistente la infecția cu *Shigella* spp. În faza inițială *Shigella* este captată de celulele M. După transitoarea epitelului intestinal bacteria este eliberată într-o vacuolă care ulterior este captată de macrofage. *Shigella* evită distrugerea prin inițierea rapidă a apoptozei macrofagelor, determinând eliminarea citokinelor proinflamatoare (IL1, IL18). *Shigella* eliberată din macrofage invadează celulele epiteliale prin membrana bazo-laterală (prin macropinocitoză dirijată), se eliberează din fagosomă și se multiplică în citoplasmă. Bacteriile se propagă intra-și intercelular grație polimerizării actinei la un pol al celulei (caracter determinat plasmidic).

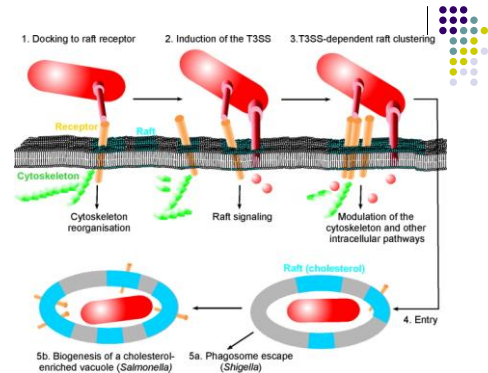
Citokinele eliberate de macrofage și celulele epiteliale determină o recrutare masivă a PMN în locul infecției, ceea ce duce la distrugerea integrității epitelului și facilitează invazia directă a submucoasei, evitând celulele M. Astfel, moartea macrofagelor, distrugerea stratului epitelial, influxul masiv al PMN determină inflamația fibrinoasă intensă a colonului, micro-abcese și ulceratii, cu apariția mucusului, puroiului și sângelui în materiile fecale.

Perioada de incubație – 2 - 4 zile

Semne clinice – febră, dureri abdominale, tenesme (spasme rectale), scaune lichide mucopurulente-sanguinolente frecvente.

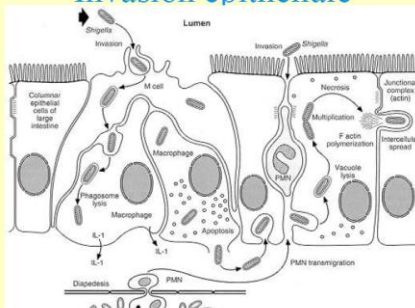
Vindecarea în 2-5 zile (clinică, apoi microbiologică)

Forme cronice sau portaj sunt posibile



124 sur 310

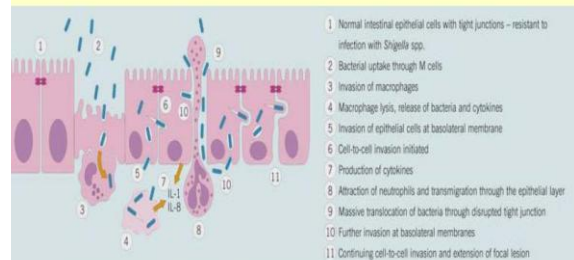
Shigella: Invasion épithéliale



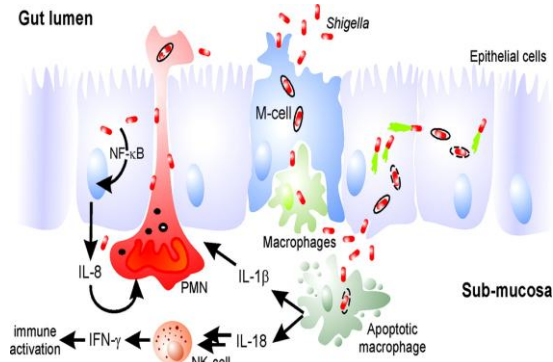
Bactériologie Médicale - M. Struelens - 3e Candidature Médecine et 2e Candidature Sciences Biomedicales

126 sur 269

Invasion de la muqueuse intestinale par Shigella



Bactériologie Médicale - M. Struelens - 3e Candidature Médecine et 2e Candidature Sciences Biomedicales



DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL DIZENTERIEI

- **Prelevate:** probe de scaun (elementele muco-sangvinolente), apa, alimente, lavaje de pe suprafețe
- **Metode de diagnostic**
 1. Examenul microscopic – RIF
 2. Examenul bacteriologic
- I. **Izolarea culturii pure pe medii DD (Endo, Levin, Ploskirev) sau îmbogățirea șighelelor în bulion selenit**

125 sur 310

Shigella : Invasion épithéliale

INVASION OF MICRO-ORGANISMS ACROSS THE INTESTINAL MUCOSA

- 1 Normal intestinal epithelial cells with tight junctions – resistant to infection with *Shigella* spp.
- 2 Bacterial uptake through M cells
- 3 Invasion of macrophages
- 4 Macrophage lysis, release of bacteria and cytokines
- 5 Invasion of epithelial cells at basolateral membrane
- 6 Cell-to-cell invasion initiated
- 7 Production of cytokines
- 8 Attraction of neutrophils and transmigration through the epithelial layer
- 9 Massive translocation of bacteria through disrupted tight junction
- 10 Further invasion at basolateral membranes
- 11 Continuing cell-to-cell invasion and extension of focal lesion

II. Coloniile L- sunt repicate pe mediile Olkenițki, Kligler pentru **acumularea culturii pure și identificare preliminară**

(lactoza/zaharoza -, glucoza A, ureea -, H₂S -)

III. **Identificarea definitivă a culturii pure**

- Caractere morfotinctoriale
 - Caractere de cultură
 - Caractere biochimice (teste primare, secundare)
 - Caractere antigenice (seroidentificarea prin RA pe lamă cu seruri imune anti-*Shigella* poli- și monovalente)
 - Fagoidentificarea
 - Virulența (testul Sereny la cobai)
 - Antibiograma
- IV. **Analiza rezultatelor și formularea răspunsului**

3. Diagnosticul serologic (din a 5-7 zi de boală)

- RA, RHAI (aduți 1:400 (*S.flexneri*), 1:200 (*S.sonnei*))
copii 1:100
coproanticorpi (Ig A – 1:80)

- ELISA
- RIFI

Imunitate: specifică de tip, 1-2 ani, umorală (IgA)

Profilaxie: vaccinuri ribosomale, inactivate, atenuate (imunitate de scurtă durată)

Tratament: antibiotice (trimetoprim, sulfamide, tetraciclină, ampicilina, etc), eubiotice, bacteriofagi, vaccin inactivat (dizenteria cronică)